

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 907**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/68** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2015 PCT/NL2015/050697**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016 WO16053107**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2015 E 15813594 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 3134128**

54 Título: **Enlazador de sulfamida, conjugados de los mismos y métodos de preparación**

30 Prioridad:

**03.10.2014 EP 14187615**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**07.02.2020**

73 Titular/es:

**SYNAFFIX B.V. (100.0%)  
Kloosterstraat 9  
5349 AB Oss, NL**

72 Inventor/es:

**VERKADE, JORGE MERIJN MATHIEU;  
WIJDEVEN, MARIA ANTONIA;  
VAN DE SANDE, PETRUS JOSEPHUS JACOBUS  
MARIA;  
VAN BERKEL, SANDER SEBASTIAAN y  
VAN DELFT, FLORIS LOUIS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 740 907 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Enlazador de sulfamida, conjugados de los mismos y métodos de preparación

**Campo técnico de la invención**

5 La presente invención se encuentra en el campo de la bioconjugación. La invención se refiere a enlazadores de sulfamida y a conjugados de los mismos, y a métodos para su preparación. Más particularmente, la invención se refiere a enlazadores que comprenden un grupo acilsulfamida y/o un grupo carbamoil sulfamida y a conjugados que comprenden dichos enlazadores. La invención se refiere además a un procedimiento para la preparación de bioconjugados que comprenden un enlazador, comprendiendo el enlazador un grupo acilsulfamida y/o un grupo carbamoil sulfamida.

**Antecedentes de la invención**

10 La bioconjugación es el procedimiento de unir dos o más moléculas, de las cuales al menos una es una biomolécula. La(s) biomolécula(s) también se puede denominar "biomolécula(s) de interés", la(s) otra(s) molécula(s) también se puede denominar "molécula diana" o "molécula de interés". Normalmente, la biomolécula de interés (BOI) consistirá en una proteína (o péptido), un glicano, un ácido nucleico (u oligonucleótido), un lípido, una hormona o un fármaco natural (o fragmentos o combinaciones de los mismos). La otra molécula de interés (MOI) también puede ser una biomolécula, lo que conduce a la formación de homodímeros o heterodímeros (u oligómeros superiores), o la otra molécula puede poseer características específicas que se imparten sobre la biomolécula de interés mediante el proceso de conjugación. Por ejemplo, la modulación de una estructura y función proteica mediante una modificación covalente con una sonda química para la detección y/o el aislamiento, ha evolucionado como una herramienta poderosa en la investigación basada en el proteoma y las aplicaciones biomédicas. El etiquetado de proteínas mediante afinidad o fluorescencia es clave para estudiar el tráfico de proteínas en su hábitat natural. Las vacunas basadas en conjugados proteína-carbohidrato han ganado importancia en la lucha contra el VIH, el cáncer, la malaria y las bacterias patógenas, mientras que los carbohidratos inmovilizados sobre micromatrices son fundamentales para la dilucidación del glicoma. Los oligonucleótidos sintéticos (ONs) de ADN y ARN requieren la introducción de una funcionalidad adecuada para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, como la tecnología de micromatrices, terapias antisentido y de silenciamiento de genes, nanotecnología y diversas aplicaciones de ciencias de los materiales. Por ejemplo, la fijación de un ligando que penetra en una célula es la estrategia más comúnmente aplicada para abordar la baja tasa de internalización de los ONs encontrados durante la terapéutica basada en oligonucleótidos (antisentido, siARN). De manera similar, la preparación de micromatrices basadas en oligonucleótidos requiere la inmovilización selectiva de los ONs sobre una superficie sólida adecuada, p. ej., vidrio.

15 Existen numerosos ejemplos de reacciones químicas adecuadas para unir covalentemente dos (o más) estructuras moleculares. Sin embargo, el etiquetado de biomoléculas plantea grandes restricciones en las condiciones de reacción que se pueden aplicar (disolvente, concentración, temperatura), mientras que el deseo de un etiquetado quimioselectivo limita la elección de grupos reactivos. Por razones obvias, los sistemas biológicos generalmente se desarrollan mejor en un entorno acuoso, lo que significa que los reactivos para la bioconjugación deben ser adecuados para una aplicación en sistemas acuosos. En general, se pueden reconocer dos conceptos estratégicos en el campo de la tecnología de la bioconjugación: (a) la conjugación basada en un grupo funcional ya presente en la biomolécula de interés, tal como por ejemplo un tiol, una amina, un alcohol o una unidad de hidroxifenol, o (b) un procedimiento de dos etapas que implica modificar uno (o varios) grupos reactivos únicos en una BOI antes del proceso de conjugación real.

20 El primer enfoque implica normalmente una cadena lateral de aminoácidos reactivos en una proteína (p. ej., cisteína, lisina, serina y tirosina) o un grupo funcional en un glicano (p. ej., amina, aldehído) o un ácido nucleico (p. ej., una funcionalidad de purina o pirimidina o alcohol). Como se resume, entre otras cosas, en G.T. Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Elsevier, 3ª ed. 2013, un gran número de grupos funcionales reactivos han quedado disponibles a lo largo de los años para el direccionamiento quimioselectivo de uno de esos grupos funcionales, tales como maleimida, haloacetamida, éster activado, carbonato activado, sulfonil haluro, derivado de tiol activado, alqueno, alquino, alenamida y más, en donde cada uno de los cuales requiere sus propias condiciones específicas para la conjugación (pH, concentración, estequiometría, luz, etc.). De manera más prominente, la conjugación de cisteína-maleimida destaca en la conjugación de proteínas debido a su tasa de reacción elevada y su quimioselectividad. Sin embargo, cuando no hay cisteína disponible para la conjugación, como ocurre en muchas proteínas y ciertamente en otras biomoléculas, a menudo se requieren otros métodos, en donde cada uno de los cuales es víctima de sus propias limitaciones.

25 Una solución elegante y ampliamente aplicable para la bioconjugación implica el enfoque de dos etapas. Aunque la conjugación en dos etapas es más laboriosa a través de una funcionalidad modificada, generalmente conduce a una mayor selectividad (especificidad del sitio) que la conjugación con una funcionalidad natural. Además de eso, se puede lograr una estabilidad total mediante una selección adecuada de la estructura artificial, lo que puede ser un inconveniente importante en la conjugación de una etapa sobre una funcionalidad natural, en particular para la conjugación de cisteína-maleimida. Ejemplos típicos de un grupo funcional que se puede impartir sobre la BOI incluyen alquino (sometido a tensiones), alqueno (sometido a tensiones), norborneno, tetrazina, azida, fosfina, óxido

de nitrilo, nitrona, nitrilo imina, compuesto diazo, compuesto de carbonilo, (O-alkil)hidroxilamina e hidrazina, que pueden lograrse mediante un enfoque químico o de biología molecular. Se sabe que cada uno de los grupos funcionales anteriores tiene al menos otro componente de la reacción, que en muchos casos implica una reactividad mutua completa. Por ejemplo, las ciclooctinas reaccionan selectiva y exclusivamente con dipolos 1,3, los alquenos sometidos a tensiones con tetrazinas y las fosfinas con azidas, lo que conduce a enlaces covalentes completamente estables. Sin embargo, algunos de los grupos funcionales anteriores tienen la desventaja de ser altamente lipófilos, lo que puede comprometer la eficacia de la conjugación, en particular en combinación con una molécula lipófila de interés (véase más abajo).

La unidad de enlace final entre la biomolécula y la otra molécula de interés también debe ser con preferencia totalmente compatible con un entorno acuoso en términos de solubilidad, estabilidad y biocompatibilidad. Por ejemplo, un enlazador altamente lipófilo puede conducir a una agregación (durante o después de la conjugación), lo que puede aumentar significativamente los tiempos de reacción y/o reducir los rendimientos de la conjugación, en particular cuando la MOI también es de naturaleza hidrófoba. De manera similar, una combinación de un enlazador altamente lipófilo-MOI puede conducir a una unión inespecífica a superficies o parches hidrófobos específicos sobre la misma u otra biomolécula. Si el enlazador es susceptible de una hidrólisis acuosa u otras reacciones de escisión inducidas por el agua, los componentes que comprenden el bioconjugado original se separan por difusión. Por ejemplo, ciertos restos éster no son adecuados debido a la saponificación, mientras que los compuestos de  $\beta$ -hidroxicarbonilo o  $\gamma$ -dicarbonilo podrían conducir a una reacción retro-aldol o retro-Michael, respectivamente. Finalmente, el enlazador debe ser inerte frente a las funcionalidades presentes en el bioconjugado o cualquier otra funcionalidad que pueda encontrarse durante la aplicación del bioconjugado, lo que excluye, entre otros, el uso de enlazadores que presentan, por ejemplo, un resto cetona o aldehído (puede conducir a la formación de iminas), un compuesto carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado (adición de Michael), tioésteres u otros ésteres activados (formación de enlaces amida).

Los compuestos preparados a base de oligómeros lineales de etilenglicol, los llamados enlazadores PEG (polietilenglicol), gozan hoy en día de una popularidad particular en los procedimientos de conjugación biomolecular. Los enlazadores de PEG son altamente solubles en agua, no tóxicos, no antigénicos y conducen a una agregación despreciable o nula. Por esta razón, una gran variedad de enlazadores de PEG lineales, bifuncionales están disponibles comercialmente a partir de varias fuentes, los cuales se pueden modificar selectivamente en cualquier extremo con una (bio)molécula de interés. Los enlazadores de PEG son el producto de un proceso de polimerización de óxido de etileno y, por lo tanto, se obtienen normalmente como mezclas estocásticas de longitud de cadena, que se pueden convertir parcialmente en estructuras artificiales de PEG con una distribución del peso promedio centrada alrededor de 1, 2, 4 kDa o más (hasta 60 kDa). Los PEGs homogéneos y discretos (dPEGs) también se conocen con pesos moleculares de hasta 4 kDa y las versiones ramificadas de los mismos llegan hasta los 15 kDa. Curiosamente, la propia unidad de PEG imparte características particulares a una biomolécula. En particular, la PEGilación de una proteína puede conducir a una residencia prolongada *in vivo*, una degradación reducida por enzimas metabólicas y una reducción o eliminación de la inmunogenicidad proteica. Varias proteínas PEGiladas han sido aprobadas por la FDA y están actualmente en el mercado.

Debido a su alta polaridad, los enlazadores de PEG son perfectamente adecuados para la bioconjugación de restos pequeños y/o solubles en agua en condiciones acuosas. Sin embargo, en el caso de una conjugación de moléculas de interés, hidrófobas, no solubles en agua, la polaridad de una unidad de PEG puede ser insuficiente para compensar la hidrofobicidad, lo que lleva a tasas de reacción significativamente reducidas, rendimientos más bajos y problemas de agregación inducida. En tal caso, pueden requerirse enlazadores de PEG largos y/o cantidades significativas de codisolventes orgánicos para solubilizar los reactivos. Por ejemplo, en el campo de los conjugados de anticuerpo-fármaco, la fijación controlada de un número distinto de cargas útiles tóxicas a un anticuerpo monoclonal es esencial, con una carga útil seleccionada normalmente a partir del grupo de las auristatinas E o F, maitansinoides, duocarmicinas, caliqueamicinas o pirrolobenzodiazepinas (PBDs), con muchas otras en marcha. Con la excepción de la auristatina F, todas las cargas útiles tóxicas son de poco solubles en agua a nada solubles, lo que requiere codisolventes orgánicos para lograr una conjugación exitosa, tal como un 25% de dimetilacetamida (DMA) o un 50% de propilenglicol (PG). En el caso de cargas útiles hidrófobas, a pesar del uso de los codisolventes mencionados anteriormente, pueden requerirse estequiometrías elevadas de los reactivos durante la conjugación, mientras que la eficacia y el rendimiento pueden estar significativamente comprometidos debido a la agregación (en el procedimiento o después del aislamiento del producto), como se describe, por ejemplo, en Senter et al. en *Nat. Biotechn.* 2014, 24, 1256-1263. El uso de espaciadores largos de PEG (12 unidades o más) puede mejorar parcialmente la solubilidad y/o la eficacia de la conjugación, pero se ha mostrado que los espaciadores largos de PEG pueden conducir a un aclaramiento *in vivo* más rápido y, por lo tanto, influir negativamente en el perfil farmacocinético del ADC.

Partiendo de lo anterior, queda claro que existe una demanda de espaciadores polares, cortos que permitan la conjugación rápida y eficiente de restos hidrófobos. Está claro que esto último se refiere incluso a un nivel más alto en las reacciones de conjugación en las que se emplea un resto reactivo hidrófobo, tal como por ejemplo, alquinos, alquenos sometidos a tensiones y fosfinas (véase más arriba).

Los enlazadores son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento WO 2008/070291. En WO 2008/070291 se describe un enlazador para el acoplamiento de agentes de direccionamiento con componentes

de anclaje. El enlazador contiene regiones hidrófilas representadas por polietilenglicol (PEG) y una extensión que carece de centros quirales que se acopla a un agente de direccionamiento.

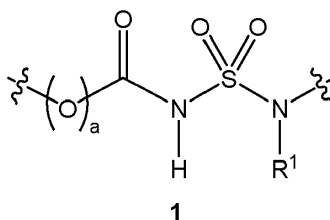
5 El documento WO 01/88535, describe un sistema enlazador de superficies para la bioconjugación, en particular un sistema enlazador que tiene un nuevo grupo espaciador hidrófilo. Los átomos o grupos hidrófilos para uso en el sistema enlazador se seleccionan a partir del grupo que consiste en O, NH, C=O (grupo ceto), O-C=O (grupo éster) y CR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, en donde R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en H, OH, alcoxi C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> y aciloxi C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>.

10 El documento WO 2014/100762, describe compuestos con un enlazador autoinmolecible hidrófilo, que se puede escindir en condiciones apropiadas e incorpora un grupo hidrófilo para proporcionar una mejor solubilidad al compuesto. Los compuestos comprenden un resto de fármaco, un resto de direccionamiento capaz de dirigirse a una población celular seleccionada y un enlazador que contiene una unidad acilo, una unidad espaciadora opcional para proporcionar una distancia entre el resto de fármaco y el resto de direccionamiento, un enlazador peptídico que se puede escindir en condiciones apropiadas, un enlazador autoinmolecible hidrófilo y un segundo espaciador autoinmolecible opcional o un enlazador de autoeliminación de ciclación. El enlazador autoinmolecible hidrófilo es, p.  
15 ej., un grupo benciloxicarbonilo.

Xiuru Li et al., *Angewandte Chemie*, edición internacional 2014, 53, 7179-7182, describen la preparación de conjugados anticuerpo-fármaco mediante una cicloadición de azida-alquino favorecida por la tensión.

### Compendio de la invención

20 La invención se refiere a un compuesto (también denominado un enlazador-conjugado) que comprende un extremo alfa y un extremo omega, en donde el compuesto comprende en el extremo alfa un grupo reactivo Q<sup>1</sup> capaz de reaccionar con un grupo funcional F<sup>1</sup> presente en una biomolécula y en el extremo omega una molécula diana (D) seleccionada a partir del grupo que consiste en un fármaco, un profármaco, un agente de diagnóstico, una proteína, un péptido, un polipéptido, un marcador peptídico, un aminoácido, un glicano, un lípido, una vitamina, un esteroide, un nucleótido, un nucleósido, un polinucleótido, un ARN, un ADN, una molécula informadora, un polímero, una  
25 superficie sólida, un hidrogel, una nanopartícula, una micropartícula y una biomolécula, en donde el compuesto comprende adicionalmente un grupo de acuerdo con la fórmula (1) o una sal del mismo:



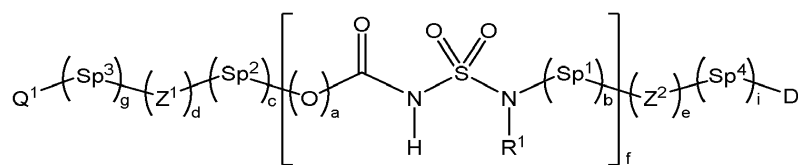
en donde:

a es 0 o 1; y

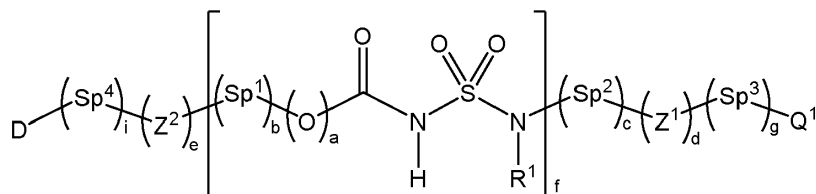
30 R<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, los grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir de O, S y NR<sup>3</sup> en donde R<sup>3</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste  
35 en hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>, o R<sup>1</sup> es una molécula diana D seleccionada a partir del grupo que consiste en un fármaco, un profármaco, un agente de diagnóstico, una proteína, un péptido, un polipéptido, un marcador peptídico, un aminoácido, un glicano, un lípido, una vitamina, un esteroide, un nucleótido, un nucleósido, un polinucleótido, un ARN, un ADN, una molécula informadora, un polímero, una superficie sólida, un hidrogel, una nanopartícula, una micropartícula y una biomolécula, en donde la molécula diana está conectada opcionalmente con N a través de un resto espaciador;

40 y Q<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en un grupo N-maleimidilo opcionalmente sustituido, un grupo (hetero)cicloalquínilo y un grupo biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo].

Más en particular, la invención se refiere a un enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4a) o (4b), o una de sus sales:



4a



4b

en donde:

a es independientemente 0 o 1;

5 b es independientemente 0 o 1;

c es 0 o 1;

d es 0 o 1;

e es 0 o 1;

f es un número entero en el intervalo de 1 a 150;

10 g es 0 o 1;

i es 0 o 1;

D es una molécula diana seleccionada a partir del grupo que consiste en un fármaco, un profármaco, un agente de diagnóstico, una proteína, un péptido, un polipéptido, un marcador peptídico, un aminoácido, un glicano, un lípido, una vitamina, un esteroide, un nucleótido, un nucleósido, un polinucleótido, un ARN, un ADN, una molécula informadora, un polímero, una superficie sólida, un hidrogel, una nanopartícula, una micropartícula y una biomolécula;

15

Q<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en un grupo N-maleimidilo opcionalmente sustituido, un grupo (hetero)cicloalquilino y un grupo biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo];

Sp<sup>1</sup> es un resto espaciador;

20 Sp<sup>2</sup> es un resto espaciador;

Sp<sup>3</sup> es un resto espaciador;

Sp<sup>4</sup> es un resto espaciador;

Z<sup>1</sup> es un grupo de conexión que conecta Q<sup>1</sup> o Sp<sup>3</sup> con Sp<sup>2</sup>, O o C(O) o N(R<sup>1</sup>);

Z<sup>2</sup> es un grupo de conexión que conecta D o Sp<sup>4</sup> con Sp<sup>1</sup>, N(R<sup>1</sup>), O o C(O); y

25 R<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, los grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir de O, S y NR<sup>3</sup> en donde R<sup>3</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste

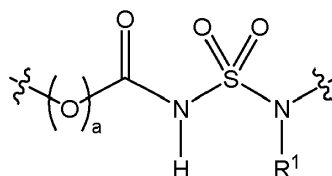
30 en hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>; o

R<sup>1</sup> es D, -[(Sp<sup>1</sup>)<sub>b</sub>-(Z<sup>2</sup>)<sub>e</sub>-(Sp<sup>4</sup>)<sub>i</sub>-D] o -[(Sp<sup>2</sup>)<sub>c</sub>-(Z<sup>1</sup>)<sub>d</sub>-(Sp<sup>3</sup>)<sub>g</sub>-Q<sup>1</sup>], en donde Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup>, Sp<sup>4</sup>, Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup>, D, Q<sup>1</sup>, b, c, d, e, g e i son como se han definido anteriormente.

La invención también se refiere a un procedimiento para la preparación de un bioconjugado, en donde el procedimiento comprende la etapa de conjugar una glicoproteína (B) con un enlazador-conjugado, haciendo reaccionar un grupo reactivo Q<sup>1</sup> de un enlazador-conjugado con un grupo funcional F<sup>1</sup> de una glicoproteína, en donde el enlazador-conjugado es un compuesto que comprende un extremo alfa y un extremo omega, en donde el

35

compuesto comprende en el extremo alfa un grupo reactivo Q<sup>1</sup> capaz de reaccionar con un grupo funcional F<sup>1</sup> presente en la glicoproteína y en el extremo omega una molécula diana (D) seleccionada a partir del grupo que consiste en un fármaco, un profármaco, un agente de diagnóstico, una proteína, un péptido, un polipéptido, un marcador peptídico, un aminoácido, un glicano, un lípido, una vitamina, un esteroide, un nucleótido, un nucleósido, un polinucleótido, un ARN, un ADN, una molécula informadora, un polímero, una superficie sólida, un hidrogel, una nanopartícula, una micropartícula y una biomolécula, en donde Q<sup>1</sup> es un grupo reactivo seleccionado a partir del grupo que consiste en grupos N-maleimidilo opcionalmente sustituidos, grupos N-alquilamido halogenados, grupos éster activados, grupos tiol, grupos alquínilo, grupos (hetero)cicloalquínilo, grupos tetrazinilo, grupos azido, grupos fosfina, grupos 1,1-bis(sulfonilmetil)-metilcarbonilo, grupos 1,2-quinona o grupos triazina, comprendiendo además el compuesto un grupo de acuerdo con la fórmula (1) o una sal del mismo:



1

en donde a y R<sup>1</sup> son como se han definido anteriormente, y en donde el grupo de acuerdo con la fórmula (1), o su sal, está situado entre dicho extremo alfa y dicho extremo omega del compuesto.

Más en particular, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un bioconjugado, comprendiendo el procedimiento la etapa de hacer reaccionar un grupo reactivo Q<sup>1</sup> de un enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4a) o (4b) como se ha definido anteriormente, con un grupo funcional F<sup>1</sup> de una glicoproteína. En una realización preferida, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un bioconjugado a través de una cicloadición, tal como una cicloadición (4+2) (por ejemplo, una reacción de Diels-Alder) o una cicloadición (3+2) (por ejemplo, una cicloadición 1,3-dipolar), preferiblemente la cicloadición 1,3-dipolar, más preferiblemente la cicloadición de alquino-azida, y lo más preferiblemente cuando Q<sup>1</sup> es o comprende un grupo alquino, tal como un grupo cicloalquino, y F<sup>1</sup> es un grupo azido. En una realización preferida adicional, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un bioconjugado, en donde la molécula diana es hidrófoba (es decir, débilmente soluble en agua), lo más preferiblemente cuando la molécula diana tiene una solubilidad en agua de a lo sumo 0,1% (p/p) en agua (20°C y 100 kPa). En una realización especialmente preferida, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un bioconjugado a través de una cicloadición, preferiblemente una cicloadición 1,3-dipolar, más preferiblemente la cicloadición de alquino-azida, y lo más preferiblemente cuando Q<sup>1</sup> es o comprende un grupo alquino y F<sup>1</sup> es un grupo azido, y en donde la molécula diana es hidrófoba, más preferiblemente en donde la molécula diana tiene una solubilidad en agua de, como máximo, el 0,1% (p/p) en agua (20°C y 100 kPa).

La invención se refiere además a un bioconjugado obtenible mediante el procedimiento de acuerdo con la invención.

### Descripción de las figuras

La Figura 1 describe el concepto general de conjugación de biomoléculas: una biomolécula de interés (BOI) que contiene uno o varios grupos funcionales F<sup>1</sup> se incuba con (un exceso de) una molécula diana D (también conocida como molécula de interés o MOI) fijada covalentemente a un grupo reactivo Q<sup>1</sup> a través de un enlazador específico. En el procedimiento de bioconjugación, tiene lugar una reacción química entre F<sup>1</sup> y Q<sup>1</sup>, formando de este modo un bioconjugado que comprende una conexión covalente entre la BOI y la MOI. La BOI puede ser, por ejemplo, un péptido/proteína, un glicano o un ácido nucleico.

La Figura 2 muestra varias estructuras de derivados de azúcares UDP de galactosamina, que pueden modificarse, p. ej., con un grupo 3-mercaptopropionilo (11a), un grupo azidoacetilo (11b) o un grupo azidodifluoroacetilo (11c).

La Figura 3 muestra esquemáticamente cómo cualquiera de los azúcares UDP 11a-c se puede fijar a una glicoproteína que comprende un resto GlcNAc 12 (p. ej., un anticuerpo monoclonal cuyo glicano está recortado por una endoglicosidasa) bajo la acción de un mutante de la galactosiltransferasa o una GalNAc-transferasa, generando de este modo un enlace 1-4 β-glicosídico entre un derivado de GalNAc y GlcNAc (compuestos 13a-c, respectivamente).

La Figura 4 muestra cómo un anticuerpo 13a-c modificado puede someterse a un procedimiento de bioconjugación mediante una adición nucleófila a maleimida (como para 13a, lo que conduce al conjugado de tioéter 14) o después de una cicloadición favorecida por la tensión con un reactivo de ciclooctino (como para 13b o 13c, lo que conduce a los triazoles 15 o 16, respectivamente).

La Figura 5 muestra las estructuras de varios compuestos en los que un grupo reactivo Q<sup>1</sup> con N-maleimidilo está conectado con un grupo pireno (D) a través de una unidad enlazadora.

- La Figura 6 muestra las estructuras de varios compuestos en donde un grupo reactivo Q<sup>1</sup> de biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo] (también conocido como grupo BCN) está conectado con bencilamina (D) a través de una unidad enlazadora.
- La Figura 7 muestra las estructuras de varios compuestos en donde un grupo reactivo Q<sup>1</sup> de biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo] (también conocido como un grupo BCN) o un grupo reactivo de dibenzoazociclooctina Q<sup>1</sup> (también conocido como grupo DIBAC o grupo DBCO) está conectado con pireno a través de una unidad enlazadora.
- La Figura 8 muestra las estructuras de varios compuestos en donde un grupo reactivo Q<sup>1</sup> de biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo] (también conocido como grupo BCN) está conectado con maitansina a través de una unidad enlazadora.
- La Figura 9 muestra las estructuras de varios compuestos en donde un grupo reactivo Q<sup>1</sup> de biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo] (también conocido como grupo BCN) está conectado con una estructura artificial Val-Cit-PABA-duocarmicina a través de una unidad enlazadora.
- La Figura 10 muestra las estructuras de varios compuestos de acuerdo con la invención, en donde un grupo reactivo Q<sup>1</sup> de biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo] (también denominado grupo BCN) se conjuga con Val-Cit-PABA-Ahx-maitansina a través de una unidad enlazadora.
- La Figura 11 muestra los tiempos de retención de la HPLC de los compuestos **19-23** y **30-38** con 0,1% de TFA o en tampón con pH 7,4.
- La Figura 12a muestra la eficacia de la conjugación de los derivados de BCN-pireno conjugados a través de un enlazador de sulfamida (compuesto **26**) o un enlazador PEG corto (compuestos **24** o **25**) con trastuzumab-N<sub>3</sub> (compuesto **13b**).
- La Figura 12b muestra la eficacia de la conjugación de los derivados de DIBAC-pireno conjugados a través de un enlazador de sulfamida (compuesto **29**) o un enlazador PEG corto (compuestos **27** o **28**) con trastuzumab-N<sub>3</sub> (compuesto **13b**).
- La Figura 13a muestra la eficacia de la conjugación de los derivados de BCN-maitansina conjugados a través de un enlazador de sulfamida (compuesto **33**) o un enlazador PEG corto (compuestos **30-32**) con trastuzumab-N<sub>3</sub> (compuesto **13b**).
- La Figura 13b muestra la eficacia de conjugación de los derivados de BCN-maitansina conjugados a través de un enlazador de sulfamida (compuesto **33**) o un enlazador PEG corto (compuestos **30-32**, con el compuesto **30** solapándose con **33**) con trastuzumab-F<sub>2</sub>-GalNAz (compuesto **13c**).
- La Figura 14a muestra la eficacia de la conjugación de los derivados de BCN-duocarmicina conjugados a través de un enlazador de sulfamida (compuesto **35**) o un enlazador PEG corto (compuesto **34**) con trastuzumab-N<sub>3</sub> (compuesto **13b**).
- La Figura 14b muestra la eficacia de la conjugación de los derivados de la BCN-duocarmicina conjugados a través de un enlazador de sulfamida (compuesto **35**) o un enlazador PEG corto (compuesto **34**) con trastuzumab-F<sub>2</sub>-GalNAz (compuesto **13c**).
- La Figura 15 muestra el esquema sintético general para convertir un alcohol (**40**) en un derivado de carbamoil sulfamida (**42**) mediante un tratamiento consecutivo con isocianato de clorosulfonilo (CSI) y una amina. La carbamoil sulfamida **42** puede convertirse en una acilsulfamida (**44**) si el alcohol de partida es *tert*-butanol, después de la desprotección del *tert*-butilo con ácido para proporcionar una sulfamida **43**, que se puede acilar para proporcionar **44**.
- La Figura 16 muestra la síntesis de varios enlazadores-conjugados en donde Q<sup>1</sup> es un grupo N-maleimidilo y D es un pireno. El compuesto **18** está de acuerdo con la invención, mientras que el compuesto **17** es un ejemplo comparativo.
- La Figura 17 muestra la síntesis de varios enlazadores-conjugados, en donde Q<sup>1</sup> es un grupo biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo] (también denominado grupo BCN) y D es un grupo bencilo.
- La Figura 18 muestra la síntesis de un enlazador-conjugado que es portador de dos grupos sulfamida en el enlazador, en donde Q<sup>1</sup> es un grupo biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo] (también denominado grupo BCN) y D es un grupo bencilo.
- La Figura 19 muestra la síntesis de varios enlazadores-conjugados, en donde Q<sup>1</sup> es un grupo biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo] (también denominado grupo BCN) y D es un grupo pireno.
- La Figura 20 muestra la síntesis de varios enlazadores-conjugados en donde Q<sup>1</sup> es un grupo heterocicloalquinilo (DIBAC) y D es un grupo pireno.
- La Figura 21 muestra la síntesis de un enlazador-conjugado que comprende dos moléculas diana D, en donde Q<sup>1</sup> es

un grupo biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo] (también denominado grupo BCN) y D es una citotoxina (maitansina).

La Figura 22 muestra un conjunto representativo de grupos funcionales ( $F^1$ ) en una biomolécula, presentes naturalmente o introducidos mediante manipulación, que después de la reacción con el grupo reactivo  $Q^1$  conducen a una conexión con el grupo  $Z^3$ . El grupo de conexión  $Z^3$  también puede ser el resultado de una reacción entre  $F^2$  y  $Q^2$ . El grupo funcional  $F^1$  también puede introducirse artificialmente (manipulación) en una biomolécula en cualquier posición elegida.

La Figura 23 muestra el grado de agregación de los bioconjugados **36-38** de acuerdo con la invención.

La Figura 24 muestra el progreso de la agregación durante un período de 2 semanas para un bioconjugado de acuerdo con la invención con un enlazador de sulfamida (**36** conjugado con **13a**) frente a un bioconjugado comparativo con un enlazador PEG (**30** conjugado con **13a**), así como trastuzumab.

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

El verbo "comprender" y sus conjugaciones, tal y como se usan en esta descripción y en las reivindicaciones, se usa en su sentido no limitativo para indicar que se incluyen los elementos que siguen a la palabra, pero que no se excluyen los elementos que no se mencionan específicamente.

Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que esté presente más de un elemento, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" generalmente significa "al menos uno-una".

Los compuestos descritos en esta descripción y en las reivindicaciones pueden comprender uno o varios centros asimétricos, y pueden existir diferentes diastereómeros y/o enantiómeros de los compuestos. La descripción de cualquier compuesto en esta descripción y en las reivindicaciones se entiende que incluye todos los diastereómeros, y mezclas de los mismos, a menos que se indique lo contrario. Además, la descripción de cualquier compuesto en esta descripción y en las reivindicaciones se entiende que incluye tanto los enantiómeros individuales, como cualquier mezcla, racémica o de otro tipo, de los enantiómeros, a menos que se indique lo contrario. Cuando la estructura de un compuesto se representa como un enantiómero específico, debe entenderse que la invención de la presente solicitud no está limitada a ese enantiómero específico.

Los compuestos pueden presentarse en diferentes formas tautómeras. Los compuestos de acuerdo con la invención se entiende que incluyen todas las formas tautómeras, a menos que se indique lo contrario. Cuando la estructura de un compuesto se representa como un tautómero específico, debe entenderse que la invención de la presente solicitud no se limita a ese tautómero específico.

Los compuestos descritos en esta descripción y en las reivindicaciones pueden existir además como diastereoisómeros *exo* y *endo*. A menos que se indique lo contrario, la descripción de cualquier compuesto en la descripción y en las reivindicaciones se entiende que incluye tanto el diastereoisómero *exo* individual como el *endo* individual de un compuesto, así como mezclas de los mismos. Cuando la estructura de un compuesto se describe como un diastereómero *exo* o *endo* específico, debe entenderse que la invención de la presente solicitud no se limita a ese diastereómero *endo* o *exo* específico.

Además, los compuestos descritos en esta descripción y en las reivindicaciones pueden existir como isómeros *cis* y *trans*. A menos que se indique lo contrario, la descripción de cualquier compuesto en la descripción y en las reivindicaciones se entiende que incluye tanto el isómero *cis* individual como el *trans* individual de un compuesto, así como mezclas de los mismos. A modo de ejemplo, cuando la estructura de un compuesto se describe como un isómero *cis*, ha de entenderse que el isómero *trans* correspondiente o mezclas del isómero *cis* y *trans* no están excluidas de la invención de la presente solicitud. Cuando la estructura de un compuesto se describe como un isómero *cis* o *trans* específico, debe entenderse que la invención de la presente solicitud no se limita a ese isómero *cis* o *trans* específico.

Los grupos alquilo no sustituidos tienen la fórmula general  $C_nH_{2n+1}$  y pueden ser lineales o ramificados. Opcionalmente, los grupos alquilo están sustituidos con uno o varios sustituyentes especificados más detalladamente en esta memoria. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, 2-propilo, t-butilo, 1-hexilo, 1-dodecilo, etc.

Un grupo cicloalquilo es un grupo alquilo cíclico. Los grupos cicloalquilo no sustituidos comprenden al menos tres átomos de carbono y tienen la fórmula general  $C_nH_{2n-1}$ . Opcionalmente, los grupos cicloalquilo están sustituidos con uno o varios sustituyentes especificados de forma adicional en esta memoria. Ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

Un grupo alquenoilo comprende uno o varios dobles enlaces carbono-carbono, y puede ser lineal o ramificado. Los grupos alquenoilo no sustituidos que comprenden un doble enlace C - C tienen la fórmula general  $C_nH_{2n-1}$ . Los grupos



- alqueniolo no sustituidos que comprenden dos dobles enlaces C - C tienen la fórmula general  $C_nH_{2n-3}$ . Un grupo alqueniolo puede comprender un doble enlace terminal carbono-carbono y/o un doble enlace interno carbono-carbono. Un grupo alqueniolo terminal es un grupo alqueniolo en el que un doble enlace carbono-carbono está situado en una posición terminal de una cadena de carbono. Un grupo alqueniolo también puede comprender dos o más dobles enlaces carbono-carbono. Ejemplos de un grupo alqueniolo incluyen etenilo, propenilo, isopropenilo, t-butenilo, 1,3-butadienilo, 1,3-pentadienilo, etc. A menos que se indique lo contrario, un grupo alqueniolo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente como se define a continuación. A menos que se indique lo contrario, un grupo alqueniolo puede estar interrumpido opcionalmente por uno o varios heteroátomos seleccionados independientemente a partir del grupo que consiste en O, N y S.
- 5
- 10 Un grupo alquiniolo comprende uno o varios triples enlaces carbono-carbono, y puede ser lineal o ramificado. Los grupos alquiniolo no sustituidos que comprenden un triple enlace C - C tienen la fórmula general  $C_nH_{2n-3}$ . Un grupo alquiniolo puede comprender un triple enlace carbono-carbono terminal y/o un triple enlace carbono-carbono interno. Un grupo alquiniolo terminal es un grupo alquiniolo en el que un triple enlace carbono-carbono está situado en una posición terminal de una cadena de carbono. Un grupo alquiniolo también puede comprender dos o más triples enlaces carbono-carbono. A menos que se indique lo contrario, un grupo alquiniolo puede estar opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes, seleccionados independientemente, como se define a continuación. Ejemplos de un grupo alquiniolo incluyen etinilo, propinilo, isopropinilo, t-butinilo, etc. A menos que se indique lo contrario, un grupo alquiniolo puede estar interrumpido opcionalmente por uno o varios heteroátomos seleccionados independientemente a partir del grupo que consiste en O, N y S.
- 15
- 20 Un grupo arilo comprende de seis a doce átomos de carbono y puede incluir estructuras monocíclicas y bicíclicas. Opcionalmente, el grupo arilo puede estar sustituido con uno o varios sustituyentes especificados más detalladamente en esta memoria. Ejemplos de grupos arilo son fenilo y naftilo.
- Los grupos arilalquilo y los grupos alquilarilo comprenden al menos siete átomos de carbono y pueden incluir estructuras monocíclicas y bicíclicas. Opcionalmente, los grupos arilalquilo y alquilarilo pueden estar sustituidos con uno o varios sustituyentes especificados adicionalmente en esta memoria. Un grupo arilalquilo es, por ejemplo, bencilo. Un grupo alquilarilo es, por ejemplo, 4-*t*-butilfenilo.
- 25
- Los grupos heteroarilo comprenden al menos dos átomos de carbono (es decir, al menos  $C_2$ ) y uno o varios heteroátomos N, O, P o S. Un grupo heteroarilo puede tener una estructura monocíclica o bicíclica. Opcionalmente, el grupo heteroarilo puede estar sustituido con uno o varios sustituyentes especificados más detalladamente en esta memoria. Ejemplos de grupos heteroarilo adecuados incluyen piridinilo, quinolinilo, pirimidinilo, pirazinilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, pirrolilo, furanilo, triazolilo, benzofuranilo, indolilo, purinilo, benzoxazolilo, tienilo, fosfolilo y oxazolilo.
- 30
- Los grupos heteroarilalquilo y los grupos alquilheteroarilo comprenden al menos tres átomos de carbono (es decir, al menos  $C_3$ ) y puede incluir estructuras monocíclicas y bicíclicas. Opcionalmente, los grupos heteroarilo pueden estar sustituidos con uno o varios sustituyentes especificados adicionalmente en esta memoria.
- 35
- Cuando un grupo arilo se indica como un grupo (hetero)arilo, la indicación se entiende que incluye un grupo arilo y un grupo heteroarilo. De manera similar, un grupo alquil(hetero)arilo se entiende que incluye un grupo alquilarilo y un grupo alquilheteroarilo, y (hetero)arilalquilo se entiende que incluye un grupo arilalquilo y un grupo heteroarilalquilo. Por lo tanto, un grupo (hetero)arilo  $C_2 - C_{24}$  debe interpretarse como que incluye un grupo heteroarilo  $C_2 - C_{24}$  y un grupo arilo  $C_6 - C_{24}$ . Del mismo modo, un grupo alquil(hetero)arilo  $C_3 - C_{24}$  se entiende que incluye un grupo alquilarilo  $C_7 - C_{24}$  y un grupo alquilheteroarilo  $C_3 - C_{24}$ , y un (hetero)arilalquilo  $C_3 - C_{24}$  se entiende que incluye un grupo arilalquilo  $C_7 - C_{24}$  y un grupo heteroarilalquilo  $C_3 - C_{24}$ .
- 40
- Un grupo cicloalquiniolo es un grupo alquiniolo cíclico. Un grupo cicloalquiniolo no sustituido que comprende un triple enlace tiene la fórmula general  $C_nH_{2n-5}$ . Opcionalmente, un grupo cicloalquiniolo está sustituido con uno o varios sustituyentes especificados más detalladamente en esta memoria. Un ejemplo de un grupo cicloalquiniolo es ciclooctinilo.
- 45
- Un grupo heterocicloalquiniolo es un grupo cicloalquiniolo interrumpido por heteroátomos seleccionados a partir del grupo de oxígeno, nitrógeno y azufre. Opcionalmente, un grupo heterocicloalquiniolo está sustituido con uno o varios sustituyentes especificados más detalladamente en esta memoria. Un ejemplo de un grupo heterocicloalquiniolo es azaciclooctinilo.
- 50
- Un grupo (hetero)arilo comprende un grupo arilo y un grupo heteroarilo. Un grupo alquil(hetero)arilo comprende un grupo alquilarilo y un grupo alquilheteroarilo. Un grupo (hetero)arilalquilo comprende un grupo arilalquilo y un grupo heteroarilalquilo. Un grupo (hetero)alquiniolo comprende un grupo alquiniolo y un grupo heteroalquiniolo. Un grupo (hetero)cicloalquiniolo comprende un grupo cicloalquiniolo y un grupo heterocicloalquiniolo.
- 55
- Un compuesto (hetero)cicloalquino se define en esta memoria como un compuesto que comprende un grupo (hetero)cicloalquiniolo.

Varios de los compuestos descritos en esta descripción y en las reivindicaciones pueden describirse como

compuestos (hetero)cicloalquinos fusionados, es decir, compuestos (hetero)cicloalquinos en los que una segunda estructura de anillo está fusionada, es decir, anulada, con el grupo (hetero)cicloalquilino. Por ejemplo, en un compuesto (hetero)ciclooctino fusionado, un cicloalquilo (por ejemplo, un ciclopropilo) o un areno (por ejemplo, benceno) puede estar anulado con el grupo (hetero)ciclooctinilo. El triple enlace del grupo (hetero)ciclooctinilo en un compuesto (hetero)ciclooctino fusionado puede estar localizado en cualquiera de las tres ubicaciones posibles, es decir, en la posición 2, 3 o 4 del resto ciclooctino (numeración según la "Nomenclatura de la IUPAC de Química Orgánica", Norma A31.2). La descripción de cualquier compuesto (hetero)ciclooctino fusionado en esta descripción y en las reivindicaciones se entiende que incluye los tres regioisómeros individuales del resto ciclooctino.

A menos que se indique lo contrario, los grupos alquilo, grupos cicloalquilo, grupos alqueno, grupos alquino, grupos (hetero)arilo, grupos (hetero)arilalquilo, grupos alquil(hetero)arilo, grupos alquileo, grupos alqueniño, grupos alquiniño, grupos cicloalquileo, grupos cicloalqueniño, grupos cicloalquiniño, grupos (hetero)arileño, grupos alquil(hetero)arileño, grupos (hetero)arilalqueniño, grupos (hetero)arilalquiniño, grupos (hetero)arilalqueniño, grupos alqueniño, grupos alcoxi, grupos alqueniño, grupos (hetero)ariloxi, grupos alquiniño y los grupos cicloalquiloxi pueden estar sustituidos con uno o varios sustituyentes seleccionados independientemente a partir del grupo que consiste en grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub>, grupos alqueno C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>, grupos alquino C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>12</sub>, grupos cicloalqueniño C<sub>5</sub> - C<sub>12</sub>, grupos cicloalquiniño C<sub>8</sub> - C<sub>12</sub>, grupos alcoxi C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub>, grupos alqueniño C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>, grupos alquiniño C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>, grupos cicloalquiloxi C<sub>3</sub> - C<sub>12</sub>, halógenos, grupos amino, grupos oxo y sililo, en donde los grupos sililo pueden estar representados por la fórmula (R<sup>20</sup>)<sub>3</sub>Si-, en donde R<sup>20</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub>, grupos alqueno C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>, grupos alquino C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>12</sub>, grupos alcoxi C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub>, grupos alqueniño C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>, grupos alquiniño C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub> y grupos cicloalquiloxi C<sub>3</sub> - C<sub>12</sub>, en donde los grupos alquilo, grupos alqueno, grupos alquino, grupos cicloalquilo, grupos alcoxi, grupos alqueniño, grupos alquiniño y grupos cicloalquiloxi están opcionalmente sustituidos, en donde los grupos alquilo, los grupos alcoxi, los grupos cicloalquilo y los grupos cicloalcoxi están opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo que consiste en O, N y S.

El término general "azúcar" se usa en esta memoria para indicar un monosacárido, por ejemplo glucosa (Glc), galactosa (Gal), manosa (Man) y fucosa (Fuc). La expresión "derivado de azúcar" se usa en esta memoria para indicar un derivado de un azúcar monosacárido, es decir, un azúcar monosacárido que comprende sustituyentes y/o grupos funcionales. Ejemplos de un derivado de azúcar incluyen amino azúcares y ácidos de azúcar, por ejemplo, glucosamina (GlcNH<sub>2</sub>), galactosamina (GalNH<sub>2</sub>), N-acetilglucosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), ácido siálico (Sia), que también se conoce como ácido N-acetilneuramínico (NeuNAc), y ácido N-acetilmurámico (MurNAc), ácido glucurónico (GlcA) y ácido idurónico (IdoA).

El término "nucleótido" se usa en esta memoria en su significado científico normal. El término "nucleótido" se refiere a una molécula que está compuesta por una nucleobase, un azúcar de cinco carbonos (ya sea ribosa o 2-desoxirribosa) y uno, dos o tres grupos fosfato. Sin el grupo fosfato, la nucleobase y el azúcar forman un nucleósido. Por lo tanto, un nucleótido también se puede llamar un monofosfato de nucleósido, un difosfato de nucleósido o un trifosfato de nucleósido. La nucleobase puede ser adenina, guanina, citosina, uracilo o timina. Los ejemplos de un nucleótido incluyen difosfato de uridina (UDP), difosfato de guanosina (GDP), difosfato de timidina (TDP), difosfato de citidina (CDP) y monofosfato de citidina (CMP).

El término "proteína" se usa en esta memoria en su significado científico normal. En esta memoria, los polipéptidos que comprenden aproximadamente 10 o más aminoácidos se consideran proteínas. Una proteína puede comprender aminoácidos naturales, pero también no naturales.

El término "glicoproteína" se usa en esta memoria en su significado científico normal y se refiere a una proteína que comprende una o varias cadenas de monosacáridos u oligosacáridos ("glicanos") unidas covalentemente a la proteína. Un glicano puede estar fijado a un grupo hidroxilo en la proteína (glicano unido a O), p. ej., al grupo hidroxilo de serina, treonina, tirosina, hidroxilisina o hidroxiprolina, o a una función amida en la proteína (N-glicoproteína), p. ej., asparagina o arginina, o a un carbono en la proteína (glicoproteína C), por ej., triptófano. Una glicoproteína puede comprender más de un glicano, puede comprender una combinación de uno o varios monosacáridos y uno o varios glicanos de oligosacáridos, y puede comprender una combinación de glicanos unidos a N, unidos a O y unidos a C. Se estima que más del 50% de todas las proteínas tienen alguna forma de glicosilación y, por lo tanto, se califican como glicoproteínas. Ejemplos de glicoproteínas incluyen PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata), CAL (lipasa de candida antártica), gp41, gp120, EPO (eritropoyetina), proteína anticongelante y anticuerpos.

El término "glicano" se usa en esta memoria en su significado científico normal y se refiere a una cadena de monosacáridos u oligosacáridos que está unida a una proteína. El término glicano, por lo tanto, se refiere a la parte de carbohidrato de una glicoproteína. El glicano se fija a una proteína a través del carbono C-1 de un azúcar, que puede no tener una sustitución adicional (monosacárido) o puede estar sustituido adicionalmente en uno o varios de sus grupos hidroxilo (oligosacárido). Un glicano natural comprende normalmente de 1 a aproximadamente 10 restos sacáridos. Sin embargo, cuando una cadena de sacáridos más larga está unida a una proteína, dicha cadena de sacáridos también se considera en esta memoria un glicano. Un glicano de una glicoproteína puede ser un monosacárido. Normalmente, un glicano monosacárido de una glicoproteína consiste en una única N-

acetilglucosamina (GlcNAc), glucosa (Glc), manosa (Man) o fucosa (Fuc) aislada, fijada covalentemente a la proteína. Un glicano también puede ser un oligosacárido. Una cadena de oligosacáridos de una glicoproteína puede ser lineal o ramificada. En un oligosacárido, el azúcar que se fija directamente a la proteína, se denomina azúcar central. En un oligosacárido, un azúcar que no está fijado directamente a la proteína y que se fija a al menos otros dos azúcares, se denomina un azúcar interno. En un oligosacárido, un azúcar que no está fijado directamente a la proteína sino a otro azúcar, es decir, que no es portador de más sustituyentes de azúcar en uno o varios de sus otros grupos hidroxilo, se denomina el azúcar terminal. Para evitar dudas, pueden existir múltiples azúcares terminales en un oligosacárido de una glicoproteína, pero solo un azúcar central. Un glicano puede ser un glicano unido a O, un glicano unido a N o un glicano unido a C. En un glicano unido a O, un glicano monosacárido u oligosacárido está unido a un átomo de O en un aminoácido de la proteína, normalmente a través de un grupo hidroxilo de serina (Ser) o treonina (Thr). En un glicano unido a N, un glicano monosacárido u oligosacárido está unido a la proteína a través de un átomo de N en un aminoácido de la proteína, normalmente a través de un nitrógeno de la amida en la cadena lateral de asparagina (Asn) o arginina (Arg). En un glicano unido a C, un glicano monosacárido u oligosacárido está unido a un átomo de C en un aminoácido de la proteína, normalmente a un átomo de C de triptófano (Trp).

El término "anticuerpo" se usa en esta memoria en su significado científico normal. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmunitario que es capaz de reconocer y de unirse a un antígeno específico. Un anticuerpo es un ejemplo de una glicoproteína. El término anticuerpo en esta memoria se usa en su sentido más amplio e incluye específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpos y anticuerpos de cadena simple y doble. El término "anticuerpo" en esta memoria también se entiende que incluye anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno del cáncer. El término "anticuerpo" se entiende que incluye anticuerpos completos, pero también fragmentos de un anticuerpo, por ejemplo un fragmento Fab de anticuerpo,  $F(ab')_2$ , un fragmento Fv o un fragmento Fc de un anticuerpo escindido, un fragmento scFv-Fc, un minicuerpo, un diacuerpo o un scFv. Además, el término incluye anticuerpos modificados genéticamente y derivados de un anticuerpo. Los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos y los anticuerpos modificados genéticamente pueden obtenerse mediante métodos que se conocen en la técnica. Entre los ejemplos típicos de anticuerpos se incluyen, entre otros, abciximab, rituximab, basiliximab, palivizumab, infliximab, trastuzumab, alemtuzumab, adalimumab, tositumomab-1131, cetuximab, ibrituximab tiuxetan, omalizumab, bevacizumab, natalizumab, ranibizumab, panitumumab, eculizumab, certolizumab pegol, golimumab, canakinumab, catumaxomab, ustekinumab, tocilizumab, ofatumumab, denosumab, belimumab, ipilimumab y brentuximab.

Un enlazador se define en esta memoria como un resto que conecta dos o más elementos de un compuesto. Por ejemplo, en un bioconjugado, una biomolécula y una molécula diana están conectadas covalentemente entre sí a través de un enlazador; en un enlazador-conjugado un grupo reactivo  $Q^1$  está conectado covalentemente con una molécula diana a través de un enlazador; en un enlazador-estructura artificial un grupo reactivo  $Q^1$  está covalentemente conectado con un grupo reactivo  $Q^2$  a través de un enlazador. Un enlazador puede comprender uno o varios restos espaciadores.

Un resto espaciador se define en esta memoria como un resto que espacia (es decir, proporciona una distancia entre ellos) y une covalentemente dos (o más) partes de un enlazador. El enlazador puede formar parte, por ejemplo, de un enlazador-estructura artificial, un enlazador-conjugado o un bioconjugado, como se define a continuación.

Un enlazador-estructura artificial se define en esta memoria como un compuesto en el que un grupo reactivo  $Q^1$  está covalentemente conectado con un grupo reactivo  $Q^2$  a través de un enlazador. Un enlazador-estructura artificial comprende un grupo reactivo  $Q^1$  capaz de reaccionar con un grupo reactivo presente en una biomolécula y un grupo reactivo  $Q^2$  capaz de reaccionar con un grupo reactivo presente en una molécula diana.  $Q^1$  y  $Q^2$  pueden ser iguales o diferentes. Un enlazador-estructura artificial también puede comprender más de un grupo reactivo  $Q^1$  y/o más de un grupo reactivo  $Q^2$ . Un enlazador-estructura artificial también se puede indicar como  $Q^1$ -Sp- $Q^2$ , en donde  $Q^1$  es un grupo reactivo capaz de reaccionar con un grupo reactivo  $F^1$  presente en una biomolécula,  $Q^2$  es un grupo reactivo capaz de reaccionar con un grupo reactivo  $F^2$  presente en una molécula diana y Sp es un resto espaciador. Cuando un enlazador-estructura artificial comprende más de un grupo reactivo  $Q^1$  y/o más de un grupo reactivo  $Q^2$ , el enlazador-estructura artificial se puede indicar como  $(Q^1)_y$ -Sp- $(Q^2)_z$ , en donde y es un número entero en el intervalo de 1 a 10 y z es un número entero en el intervalo de 1 a 10. Preferiblemente, y es 1, 2, 3 o 4, más preferiblemente y es 1 o 2 y lo más preferiblemente, y es 1. Preferiblemente, z es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, más preferiblemente z es 1, 2, 3 o 4, aún más preferiblemente z es 1, 2 o 3, incluso aún más preferiblemente z es 1 o 2 y lo más preferiblemente z es 1. Más preferiblemente, y es 1 o 2, preferiblemente 1, y z es 1, 2, 3 o 4, pero aún más preferiblemente y es 1 o 2, preferiblemente 1, y z es 1, 2 o 3, pero aún más preferiblemente y es 1 o 2, preferiblemente 1, y z es 1 o 2, y lo más preferiblemente y es 1 y z es 1.

Un enlazador-conjugado se define en esta memoria como un compuesto en el que una molécula diana está conectada covalentemente con un grupo reactivo  $Q^1$ , a través de un enlazador. Se puede obtener un enlazador-conjugado mediante una reacción de un grupo reactivo  $Q^2$  presente en un enlazador-estructura artificial con un grupo reactivo presente en una molécula diana. Un enlazador-conjugado comprende un grupo reactivo  $Q^1$  que es capaz de reaccionar con un grupo reactivo presente en una biomolécula. Un enlazador-conjugado puede

comprender uno o varios restos espaciadores. Un enlazador-conjugado puede comprender más de un grupo reactivo Q<sup>1</sup> y/o más de una molécula diana.

5 Un bioconjugado se define en esta memoria como un compuesto en el que una biomolécula está conectada covalentemente con una molécula diana a través de un enlazador. Un bioconjugado comprende una o varias biomoléculas y/o una o varias moléculas diana. El enlazador puede comprender uno o varios restos espaciadores.

Cuando un compuesto en esta memoria se denomina un compuesto que comprende un extremo alfa y un extremo omega, dicho compuesto comprende dos (o más) extremos, en donde el primer extremo se denomina el extremo alfa y el segundo extremo se denomina el extremo omega. Dicho compuesto puede comprender más de dos extremos, es decir, un tercer extremo, un cuarto extremo, etc., pueden estar presentes en el compuesto.

10 Una biomolécula se define en esta memoria como cualquier molécula que se puede aislar a partir de la naturaleza o cualquier molécula compuesta por elementos fundamentales moleculares más pequeños que son los constituyentes de estructuras macromoleculares obtenidas a partir de la naturaleza, en particular ácidos nucleicos, proteínas, glicanos y lípidos. Ejemplos de una biomolécula incluyen una enzima, una proteína (no catalítica), un polipéptido, un péptido, un aminoácido, un oligonucleótido, un monosacárido, un oligosacárido, un polisacárido, un glicano, un lípido  
15 y una hormona.

Una molécula diana, también denominada molécula de interés (MOI), se define en esta memoria como una estructura molecular que posee una propiedad deseada que se imparte en la biomolécula después de la conjugación.

20 La expresión "sal del mismo" significa un compuesto formado cuando un protón ácido, normalmente un protón de un ácido, se reemplaza por un catión, tal como un catión metálico o un catión orgánico, y similares. Cuando es aplicable, la sal es una sal farmacéuticamente aceptable, aunque esto no es necesario para las sales que no están destinadas a la administración a un paciente. Por ejemplo, en una sal de un compuesto, el compuesto puede estar protonado por un ácido inorgánico u orgánico para formar un catión, en donde la base conjugada del ácido inorgánico u orgánico es el componente aniónico de la sal.

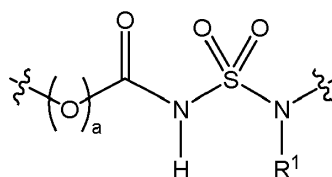
25 La expresión sal "farmacéuticamente aceptada" significa una sal que es aceptable para la administración a un paciente, tal como un mamífero (sales con contraiones que son aceptablemente seguras en mamíferos para un régimen de dosificación dado). Esas sales se pueden obtener a partir de bases inorgánicas u orgánicas farmacéuticamente aceptables y a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. "Sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de un compuesto, cuyas sales se  
30 obtienen a partir de una variedad de contraiones orgánicos e inorgánicos conocidos en la técnica y que incluyen, por ejemplo, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio, etc., y cuando la molécula contiene una funcionalidad básica, sales de ácidos orgánicos o inorgánicos, como clorhidrato, bromhidrato, formiato, tartrato, besilato, mesilato, acetato, maleato, oxalato, etc.

#### Enlazador-conjugado

35 En esta memoria, se describe un enlazador de sulfamida y conjugados de dicho enlazador de sulfamida. La expresión "enlazador de sulfamida" se refiere a un enlazador que comprende un grupo sulfamida, más particularmente un grupo acilsulfamida [-C(O)-N(H)-S(O)<sub>2</sub>-N(R<sup>1</sup>)-] y/o un grupo carbamoil sulfamida [-O-C(O)-N(H)-S(O)<sub>2</sub>-N(R<sup>1</sup>)-].

40 La presente invención se refiere al uso de un enlazador de sulfamida de acuerdo con la invención en un procedimiento para la preparación de un bioconjugado. La invención se refiere además a un procedimiento para la preparación de un bioconjugado y a un bioconjugado obtenible por dicho procedimiento. Dicho procedimiento para la preparación de un bioconjugado se describe con más detalle a continuación.

45 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto que comprende un extremo alfa y un extremo omega, comprendiendo el compuesto en el extremo alfa un grupo reactivo Q<sup>1</sup> capaz de reaccionar con un grupo funcional F<sup>1</sup> presente en una glicoproteína y en el extremo omega una molécula diana D seleccionada a partir del grupo que consiste en un fármaco, un profármaco, un agente de diagnóstico, una proteína, un péptido, un polipéptido, un marcador peptídico, un aminoácido, un glicano, un lípido, una vitamina, un esteroide, un nucleótido, un nucleósido, un polinucleótido, un ARN, un ADN, una molécula informadora, un polímero, una superficie sólida, un hidrogel, una nanopartícula, una micropartícula y una biomolécula, comprendiendo el compuesto además un grupo  
50 de acuerdo con la fórmula (1) o una sal del mismo:



1

en donde:

a es 0 o 1; y

5 R<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, los grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir de O, S y NR<sup>3</sup>, en donde R<sup>3</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>, o R<sup>1</sup> es una molécula diana D, en donde la molécula diana está conectada  
10 opcionalmente con N a través de un resto espaciador;

y Q<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en un grupo N-maleimidilo opcionalmente sustituido, un grupo (hetero)cicloalquinilo y un grupo biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo].

Dicho compuesto también se conoce como un enlazador-conjugado. Un enlazador-conjugado se define en esta memoria como un compuesto en el que una molécula diana está conectada covalentemente con un grupo reactivo Q<sup>1</sup>, a través de un enlazador. El compuesto comprende un extremo alfa y un extremo omega, en otras palabras, el compuesto comprende un primer extremo y un segundo extremo. El primer extremo del compuesto también puede denominarse un extremo alfa, y el segundo extremo también puede denominarse un extremo omega del compuesto. Las expresiones "extremo alfa" y "extremo omega" son conocidas por los expertos en la materia. La invención también se refiere por tanto a un compuesto que comprende un primer extremo y un segundo extremo, comprendiendo el compuesto en el primer extremo un grupo reactivo Q<sup>1</sup> capaz de reaccionar con un grupo funcional F<sup>1</sup> presente en una glicoproteína y en el segundo extremo una molécula diana D, comprendiendo el compuesto además un grupo de acuerdo con la fórmula (1) o una de sus sales, en donde el grupo de acuerdo con la fórmula (1), o la sal del mismo, está situado entre dicho primer extremo y dicho segundo extremo del compuesto, y en donde el grupo de acuerdo con la fórmula (1) es como se ha definido anteriormente.

25 En el compuesto de acuerdo con la invención, el grupo de acuerdo con la fórmula (1), o la sal del mismo, está situado entre dicho extremo alfa y dicho extremo omega del compuesto. El grupo reactivo Q<sup>1</sup> se une covalentemente al extremo alfa del compuesto, y la molécula diana D se une covalentemente a un extremo omega del compuesto.

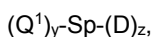
El compuesto de acuerdo con la invención también puede denominarse un enlazador-conjugado. En el enlazador-conjugado de acuerdo con la invención, una molécula diana D está fijada covalentemente a un grupo reactivo Q<sup>1</sup> a través de un enlazador, y dicho enlazador comprende un grupo de acuerdo con la fórmula (1), o una sal del mismo, como se ha definido anteriormente.

Cuando el enlazador-conjugado de acuerdo con la invención comprende una sal del grupo de acuerdo con la fórmula (1), la sal es preferiblemente una sal farmacéuticamente aceptable.

35 El enlazador-conjugado de acuerdo con la invención puede comprender más de una molécula diana D. Por consiguiente, el enlazador-conjugado puede comprender de este modo más de un extremo omega, p. ej., un segundo extremo omega (tercero, cuarto, quinto, etc.), el segundo extremo omega (tercero, cuarto, quinto, etc.) puede estar fijado covalentemente a una molécula diana. De manera similar, el enlazador-conjugado puede comprender más de un grupo reactivo Q<sup>1</sup>, es decir, el enlazador-conjugado puede comprender más de un extremo alfa. Cuando está presente más de un grupo reactivo Q<sup>1</sup>, los grupos Q<sup>1</sup> pueden ser iguales o diferentes, y cuando más de una molécula diana D está presente, las moléculas diana D pueden ser iguales o diferentes.

Por lo tanto, el enlazador-conjugado de acuerdo con la invención también se puede indicar como (Q<sup>1</sup>)<sub>y</sub>-Sp-(D)<sub>z</sub>, en donde y es un número entero en el intervalo de 1 a 10 y z es un número entero en el intervalo de 1 a 10.

La invención también se refiere por ello a un compuesto de acuerdo con la fórmula:



45 en donde:

y es un número entero en el intervalo de 1 a 10;

z es un número entero en el intervalo de 1 a 10;

Q<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en un grupo N-maleimidilo opcionalmente sustituido, un grupo (hetero)cicloalquinilo y un grupo biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo;

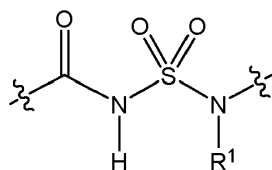
5 D es una molécula diana seleccionada a partir del grupo que consiste en un fármaco, un profármaco, un agente de diagnóstico, una proteína, un péptido, un polipéptido, un marcador peptídico, un aminoácido, un glicano, un lípido, una vitamina, un esteroide, un nucleótido, un nucleósido, un polinucleótido, un ARN, un ADN, una molécula informadora, un polímero, una superficie sólida, un hidrogel, una nanopartícula, una micropartícula y una biomolécula;

10 Sp es un resto espaciador, en donde un resto espaciador se define como un resto que separa (es decir, proporciona una cierta distancia entre) y une covalentemente el grupo reactivo Q<sup>1</sup> y una molécula diana D; y

en donde dicho resto espaciador comprende un grupo de acuerdo con la Fórmula (1) o una de sus sales, en donde el grupo de acuerdo con la Fórmula (1) es como se ha definido anteriormente.

15 Preferiblemente, y es 1, 2, 3 o 4, más preferiblemente y es 1 o 2 y lo más preferiblemente, y es 1. Preferiblemente, z es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, más preferiblemente z es 1, 2, 3 o 4, incluso más preferiblemente z es 1, 2 o 3, aún más preferiblemente z es 1 o 2 y lo más preferiblemente z es 1. Más preferiblemente, y es 1 o 2, preferiblemente 1, y z es 1, 2, 3 o 4, pero aún más preferiblemente y es 1 o 2, preferiblemente 1, y z es 1, 2 o 3, y aún más preferiblemente y es 1 o 2, preferiblemente 1, y z es 1 o 2, y lo más preferiblemente y es 1 y z es 1. En una realización preferida, el enlazador-conjugado está de acuerdo con la fórmula Q<sup>1</sup>-Sp-(D)<sub>4</sub>, Q<sup>1</sup>-Sp-(D)<sub>3</sub>, Q<sup>1</sup>-Sp-(D)<sub>2</sub> o Q<sup>1</sup>-Sp-D.

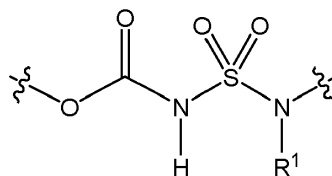
20 El enlazador-conjugado de acuerdo con la invención comprende un grupo de acuerdo con la fórmula (1) tal como se ha definido anteriormente, o una sal del mismo. En una realización preferida, el enlazador-conjugado de acuerdo con la invención comprende un grupo de acuerdo con la fórmula (1) en donde a es 0, o una sal del mismo. En esa realización, el compuesto comprende por tanto un grupo de acuerdo con la fórmula (2) o una sal del mismo:



2

en donde R<sup>1</sup> es como se ha definido anteriormente.

25 En otra realización preferida, el enlazador-conjugado de acuerdo con la invención comprende un grupo de acuerdo con la fórmula (1) en donde a es 1, o una sal del mismo. En esa realización, el enlazador-conjugado comprende por tanto un grupo de acuerdo con la fórmula (3) o una sal del mismo:



3

en donde R<sup>1</sup> es como se ha definido anteriormente.

30 En los grupos de acuerdo con la fórmula (1), (2) y (3), R<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, los grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir de O, S y NR<sup>3</sup>, en donde R<sup>3</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>, o R<sup>1</sup> es una molécula diana D, en donde la molécula diana está conectada opcionalmente con N a través de un resto espaciador;

35 En una realización preferida, R<sup>1</sup> es hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>20</sub>, más preferiblemente R<sup>1</sup> es hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>16</sub>, incluso más preferiblemente R<sup>1</sup> es hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>10</sub>, en donde el grupo alquilo está opcionalmente sustituido y opcionalmente interrumpido por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir de O, S y NR<sup>3</sup>, preferiblemente O, en donde R<sup>3</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que

40

consiste en hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>. En una realización preferida, R<sup>1</sup> es hidrogeno. En otra realización preferida, R<sup>1</sup> es un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>20</sub>, más preferiblemente un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>16</sub>, incluso más preferiblemente un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>10</sub>, en donde el grupo alquilo está opcionalmente interrumpido por uno o varios átomos de O, y en donde el grupo alquilo está opcionalmente sustituido con un grupo -OH, preferiblemente un grupo -OH terminal.

5 En esa realización, se prefiere además que R<sup>1</sup> sea una cadena de (poli)etilenglicol que comprende un grupo terminal -OH. En otra realización preferida, R<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo y t-butilo, más preferiblemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo e i-propilo, e incluso más preferiblemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, metilo y etilo. Sin embargo, aún más preferiblemente R<sup>1</sup> es hidrógeno o metilo, y lo más preferiblemente R<sup>1</sup> es hidrogeno

10 En otra realización preferida, R<sup>1</sup> es una molécula diana D. Opcionalmente, la molécula diana D está conectada con N a través de uno o varios restos espaciadores. El resto espaciador, si está presente, se define como un resto que separa, es decir, proporciona una cierta distancia entre, y une covalentemente la molécula diana D y N. La molécula diana D y sus realizaciones preferidas se describen con más detalle a continuación.

15 Cuando el enlazador-conjugado de acuerdo con la invención comprende dos o más moléculas diana D, las moléculas diana D pueden diferir entre sí.

La molécula diana se selecciona a partir del grupo que consiste en un fármaco, un profármaco, un agente de diagnóstico, una proteína, un péptido, un polipéptido, un marcador peptídico, un aminoácido, un glicano, un lípido, una vitamina, un esteroide, un nucleótido, un nucleósido, un polinucleótido, un ARN, un ADN, una molécula informadora, un polímero, una superficie sólida, un hidrogel, una nanopartícula, una micropartícula y una biomolécula.

20

Los inventores han encontrado que el uso de un enlazador de sulfamida de acuerdo con la invención mejora la solubilidad del enlazador-conjugado, lo que a su vez mejora significativamente la eficacia de la conjugación. Al emplear enlazadores convencionales, una conjugación eficaz se ve obstaculizada frecuentemente por la relativamente baja solubilidad del enlazador-conjugado en medios acuosos, especialmente cuando se usa una

25 molécula diana relativamente hidrófoba o insoluble en agua. En una realización particularmente preferida, la molécula diana en su forma no conjugada es hidrófoba, normalmente tiene una solubilidad en agua de a lo sumo un 1% (p/p), preferiblemente a lo sumo un 0,1% (p/p), lo más preferiblemente a lo sumo un 0,01% (p/p), determinada a 20°C y 100 kPa. Incluso tales moléculas diana insolubles en agua se someten de forma eficaz a una conjugación cuando se funcionalizan con un enlazador de sulfamida de acuerdo con la invención. En la presente memoria, la

30 "forma no conjugada" se refiere a la molécula diana que no está funcionalizada o conjugada con el enlazador de acuerdo con la invención. Tales formas no conjugadas de moléculas diana son conocidas por los expertos.

La expresión "sustancia activa" en esta memoria se refiere a una sustancia farmacológica y/o biológica, es decir, una sustancia que es biológica y/o farmacéuticamente activa. En el contexto de la invención, las sustancias activas se seleccionan a partir de un fármaco, un profármaco, un agente de diagnóstico, una proteína, un péptido, un

35 polipéptido, un marcador peptídico, un aminoácido, un glicano, un lípido, una vitamina, un esteroide, un nucleótido, un nucleósido, un polinucleótido, un ARN o un ADN. Los ejemplos de marcadores peptídicos incluyen péptidos que penetran en las células, como la lactoferrina humana o la poliarginina. Un ejemplo de un glicano es la oligomanosa. Un ejemplo de un aminoácido es lisina.

Cuando la molécula diana es una sustancia activa, la sustancia activa se selecciona preferiblemente a partir del grupo que consiste en fármacos y profármacos. Más preferiblemente, la sustancia activa se selecciona a partir del grupo que consiste en compuestos farmacéuticamente activos, en particular compuestos de peso molecular bajo a medio (por ejemplo, de aproximadamente 200 a aproximadamente 2500 Da, preferiblemente de aproximadamente 300 a aproximadamente 1750 Da). En una realización preferida adicional, la sustancia activa se selecciona a partir del grupo que consiste en citotoxinas, agentes antivíricos, agentes antibacterianos, péptidos y oligonucleótidos. Los

45 ejemplos de citotoxinas incluyen colchicina, alcaloides de la vinca, antraciclina, camptotecinas, doxorubicina, daunorubicina, taxanos, calicheamicinas, tubulisin, irinotecanos, un inhibidor peptídico, amanitina, deBouganina, duocarmicinas, maitansinas, auristatinas o pirrolbenzodiazepinas (PBDs). Debido a su escasa solubilidad en el agua, las sustancias activas preferidas incluyen alcaloides de la vinca, antraciclina, camptotecinas, taxanos, tubulisin, amanitina, duocarmicinas, maitansinas, auristatinas y pirrolbenzodiazepinas, en particular alcaloides de

50 la vinca, antraciclina, camptotecinas, taxanos, tubulisin, amanitina y auristatinas.

La expresión "molécula informadora" en esta memoria se refiere a una molécula cuya presencia se detecta fácilmente, por ejemplo, un agente de diagnóstico, un colorante, un fluoróforo, un marcador de isótopos radiactivos, un agente de contraste, un agente de formación de imágenes por resonancia magnética o un marcador de masa.

Los expertos en la técnica conocen una amplia variedad de fluoróforos, también denominados sondas fluorescentes. Varios fluoróforos se describen con más detalle, p. ej., en G.T. Hermanson, "*Bioconjugate Techniques*", Elsevier, 3ª ed. 2013, capítulo 10: "*Fluorescent probes*", p. 395 - 463. Los ejemplos de un fluoróforo incluyen todos los tipos de Alexa Fluor (por ejemplo, Alexa Fluor 555), colorantes de cianina (por ejemplo, Cy3 o Cy5) y derivados de colorantes de cianina, derivados de cumarina, fluoresceína y derivados de fluoresceína, rodamina y derivados de rodamina, derivados de dipirrometeno de boro, derivados de pireno, derivados de naftalimida, derivados de ficobiliproteína (por

55

ejemplo, alofocianina), cromomicina, quelatos de lantánidos y nanocristales de punto cuántico. Debido a su escasa solubilidad en agua, los fluoróforos preferidos incluyen colorantes de cianina, derivados de cumarina, fluoresceína y sus derivados, derivados de pireno, derivados de naftalimida, cromomicina, quelatos de lantánido y nanocristales de punto cuántico, en particular derivados de cumarina, fluorescencia, derivados de pirina y cromomicina.

5 Los ejemplos de un marcador de isótopos radioactivos incluyen  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{114\text{m}}\text{In}$ ,  $^{115}\text{In}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{88}\text{Y}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{186}\text{Rh}$ ,  $^{188}\text{Rh}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$  y  $^{10}\text{B}$ , que está conectado opcionalmente a través de un resto quelante tal como, por ejemplo, DTPA (anhídrido dietilentriaminopentaacético), DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano- $N,N',N'',N'''$ -tetraacético), NOTA (ácido 1,4,7-triazaciclononano  $N,N',N''$ -triacético), TETA (ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano- $N,N',N'',N'''$ -tetraacético),  
10 DTTA (ácido  $N'$ -( $p$ -isotiocianatobencil)-dietilentriamina- $N',N^2,N^3,N^3$ -tetraacético), deferoxamina o DFA ( $N'$ -[5-[[4-[[5-(acetilhidroxiamino)pentil]amino]-1,4-dioxobutil]hidroxiamino]pentil]- $N$ -(5-aminopentil)- $N$ -hidroxibutanodiamida) o HYNIC (hidrazino-nicotinamida). Las técnicas de marcado isotópico son conocidas por los expertos en la técnica, y se describen con más detalle, p. ej., G. G.T. Hermanson, "*Bioconjugate Techniques*", Elsevier, 3ª ed. 2013, capítulo 12: "Isotopic labelling techniques", p. 507 - 534.

15 Los polímeros adecuados para uso como una molécula diana D en el compuesto de acuerdo con la invención y conocido por un experto en la técnica y varios ejemplos se describen con más detalle, p. ej., en G.T. Hermanson y "*Bioconjugate Techniques*", Elsevier, 3ª ed. 2013, capítulo 18: "*PEGylation and synthetic polymer modification*", p. 787 - 838. Cuando la molécula diana D es un polímero, la molécula diana D se selecciona preferiblemente de manera independiente a partir del grupo que consiste en un poli(etilenglicol) (PEG), un poli(óxido de etileno) (PEO),  
20 un polipropilenglicol (PPG), un poli(óxido de propileno) (PPO), un 1,x-diaminoalcano polímero (en donde x es el número de átomos de carbono en el alcano, y preferiblemente x es un número entero en el intervalo de 2 a 200, preferiblemente de 2 a 10), una (poli)etilenglicol diamina (por ejemplo, 1,8-diamino-3,6-dioxaoctano y equivalentes que comprenden cadenas de etilenglicol más largas), un polisacárido (por ejemplo, dextrano), un poli(aminoácido) (por ejemplo, una poli(L-lisina)) y un poli(alcohol vinílico). Debido a su escasa solubilidad en agua, los polímeros preferidos incluyen un polímero de 1,x-diaminoalcano y poli(alcohol vinílico).

Las superficies sólidas adecuadas para uso como una molécula diana D son conocidas por los expertos en la técnica. Una superficie sólida es, por ejemplo, una superficie funcional (por ejemplo, una superficie de un nanomaterial, un nanotubo de carbono, un fullereno o una cápsida de virus), una superficie de metal (por ejemplo, una superficie de titanio, oro, plata, cobre, níquel, estaño, rodio o zinc), una superficie de aleación metálica (en donde la aleación es de, por ejemplo, aluminio, bismuto, cromo, cobalto, cobre, galio, oro, indio, hierro, plomo, magnesio, mercurio, níquel, potasio, plutonio, rodio, escandio, plata, sodio, titanio, estaño, uranio, cinc y/o circonio), una superficie de polímero (en donde el polímero es, por ejemplo, poliestireno, poli(cloruro de vinilo), polietileno, polipropileno, poli(dimetilsiloxano) o polimetilmetacrilato, poli(acrilamida), una superficie de vidrio, una superficie de silicona, una superficie de soporte de cromatografía (en donde el soporte de cromatografía es, por ejemplo, un soporte de sílice, un soporte de agarosa, un soporte de celulosa o un soporte de alúmina), etc. Cuando la molécula diana D es una superficie sólida, se prefiere que D se seleccione independientemente a partir del grupo que consiste en una superficie funcional o una superficie de polímero.

Los hidrogeles son conocidos por los expertos en la técnica. Los hidrogeles son redes hinchadas por el agua, formadas por enlaces cruzados entre los constituyentes poliméricos. Véase, por ejemplo, A. S. Hoffman, *Adv. Drug Delivery Rev.* 2012, 64, 18. Cuando la molécula diana es un hidrogel, se prefiere que el hidrogel esté compuesto por polietilenglicol (PEG) como base polimérica.

Las micropartículas y nanopartículas adecuadas para uso como una molécula diana D son conocidas por los expertos en la técnica. Se describe una variedad de micropartículas y nanopartículas adecuadas, p. ej., en G.T. Hermanson, "*Bioconjugate Techniques*", Elsevier, 3ª ed. 2013, capítulo 14: "Microparticles and nanoparticles", p. 549 - 587. Las micropartículas o nanopartículas pueden tener cualquier forma, por ejemplo, esferas, varillas, tubos, cubos, triángulos y conos. Preferiblemente, las micropartículas o nanopartículas tienen forma esférica. La composición química de las micropartículas y nanopartículas puede variar. Cuando la molécula diana D es una micro o una nanopartícula, la micropartícula o nanopartícula es, por ejemplo, una micropartícula o nanopartícula polimérica, una micropartícula o nanopartícula de sílice o una micropartícula o nanopartícula de oro. Cuando la partícula es una micropartícula o nanopartícula polimérica, el polímero es preferiblemente poliestireno o un copolímero de estireno (por ejemplo, un copolímero de estireno y divinilbenceno, butadieno, acrilato y/o viniltolueno), poli(metacrilato de metilo) (PMMA), poliviniltolueno, poli(metacrilato de hidroxietilo) (pHEMA) o poli(dimetacrilato de etilenglicol/metacrilato de 2-hidroxietilo) [poli(EDGMA/HEMA)]. Opcionalmente, la superficie de las micropartículas o nanopartículas se modifica, por ejemplo, con detergentes, mediante polimerización por injerto de polímeros secundarios o por fijación covalente de otro polímero o de restos espaciadores, etc.

La molécula diana D también puede ser una biomolécula. Las biomoléculas, y sus realizaciones preferidas, se describen con más detalle a continuación. Cuando la molécula diana D es una biomolécula, se prefiere que la biomolécula se seleccione a partir del grupo que consiste en proteínas (que incluyen glicoproteínas y anticuerpos), polipéptidos, péptidos, glicanos, lípidos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, polisacáridos, oligosacáridos, enzimas, hormonas, aminoácidos y monosacáridos.



El enlazador-conjugado de acuerdo con la invención comprende un grupo reactivo Q<sup>1</sup> que es capaz de reaccionar con un grupo funcional F<sup>1</sup> presente en una glicoproteína. Los expertos en la técnica conocen los grupos funcionales y pueden definirse como cualquier entidad molecular que imparte una propiedad específica sobre la molécula que la alberga. Por ejemplo, un grupo funcional en una glicoproteína puede constituir un grupo amino, un grupo tiol, un ácido carboxílico, un grupo alcohol, un grupo carbonilo, un grupo fosfato o un grupo aromático. El grupo funcional en la glicoproteína puede estar presente de forma natural o puede estar colocado en la glicoproteína mediante una técnica específica, por ejemplo, una técnica (bio)química o una técnica genética. El grupo funcional que se coloca en la glicoproteína puede ser un grupo funcional que está presente en la naturaleza de forma natural, o puede ser un grupo funcional que se prepara por síntesis química, por ejemplo, una azida, un alquino terminal o un resto fosfina. En esta memoria, la expresión "grupo reactivo" puede referirse a un cierto grupo que comprende un grupo funcional, pero también a un grupo funcional en sí mismo. Por ejemplo, un grupo ciclooctinilo es un grupo reactivo que comprende un grupo funcional, a saber, un triple enlace C - C. De manera similar, un grupo N-maleimidilo es un grupo reactivo, que comprende un doble enlace C - C como grupo funcional. Sin embargo, un grupo funcional, por ejemplo un grupo funcional azido, un grupo funcional tiol o un grupo funcional amino, también se pueden denominar en esta memoria un grupo reactivo.

El enlazador-conjugado puede comprender más de un grupo reactivo Q<sup>1</sup>. Cuando el enlazador-conjugado comprende dos o más grupos reactivos Q<sup>1</sup>, los grupos reactivos Q<sup>1</sup> pueden diferir unos de otros. Preferiblemente, el enlazador-conjugado comprende un grupo reactivo Q<sup>1</sup>.

El grupo reactivo Q<sup>1</sup> que está presente en el enlazador-conjugado, es capaz de reaccionar con un grupo funcional F<sup>1</sup> que está presente en una glicoproteína. En otras palabras, el grupo reactivo Q<sup>1</sup> tiene que ser complementario a un grupo funcional F<sup>1</sup> presente en una glicoproteína. En esta memoria, un grupo reactivo se dice que es "complementario" a un grupo funcional, cuando dicho grupo reactivo reacciona selectivamente con dicho grupo funcional, opcionalmente en presencia de otros grupos funcionales. Los grupos reactivos y funcionales complementarios son conocidos por los expertos en la técnica, y se describen con más detalle a continuación.

En el enlazador-conjugado de acuerdo con la invención, el grupo reactivo Q<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en grupos N-maleimidilo opcionalmente sustituidos, grupos (hetero)cicloalquinilo y grupos biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo]. En el procedimiento para la preparación de un bioconjugado de acuerdo con la invención, Q<sup>1</sup> es un grupo reactivo seleccionado a partir del grupo que consiste en grupos N-maleimidilo opcionalmente sustituidos, grupos N-alquilamido halogenados, grupos éster activados, grupos tiol, grupos alquinilo, grupos (hetero)cicloalquinilo, grupos tetrazinilo, grupos azido, grupos fosfina, grupos 1,1-bis(sulfonilmetil)-metilcarbonilo, grupos 1,2-quinona o grupos triazina

En una realización preferida, Q<sup>1</sup> es un grupo N-maleimidilo. Cuando Q<sup>1</sup> es un grupo N-maleimidilo, Q<sup>1</sup> está preferiblemente sin sustituir. Por lo tanto, Q<sup>1</sup> está preferiblemente de acuerdo con la fórmula (9a), como se muestra más abajo.

En otra realización preferida, Q<sup>1</sup> es un grupo N-alquilamido halogenado. Cuando Q<sup>1</sup> es un grupo N-alquilamido halogenado, se prefiere que Q<sup>1</sup> esté de acuerdo con la fórmula (9b), como se muestra a continuación, en donde k es un número entero en el intervalo de 1 a 10 y R<sup>4</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en -Cl, -Br e -I. Preferiblemente k es 1, 2, 3 o 4, más preferiblemente k es 1 o 2 y lo más preferiblemente k es 1. Preferiblemente, R<sup>4</sup> es -I o -Br. Más preferiblemente, k es 1 o 2 y R<sup>4</sup> es -I o -Br, y lo más preferiblemente k es 1 y R<sup>4</sup> es -I o -Br.

En otro aspecto, Q<sup>1</sup> es un grupo sulfoniloxi N-alquilamido. Cuando Q<sup>1</sup> es un grupo sulfoniloxi N-alquilamido, se prefiere que Q<sup>1</sup> esté de acuerdo con la fórmula (9b), como se muestra a continuación, en donde k es un número entero en el intervalo de 1 a 10 y R<sup>4</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en -O-mesilo, -O-fenilsulfonilo y -O-tosilo. Preferiblemente k es 1, 2, 3 o 4, más preferiblemente k es 1 o 2, aún más preferiblemente k es 1. Lo más preferiblemente, k es 1 y R<sup>4</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en -O-mesilo, -O-fenilsulfonilo y -O-tosilo.

En otra realización preferida, Q<sup>1</sup> es un grupo éster activado. Los grupos éster activados son conocidos por los expertos en la técnica. Un grupo éster activado se define en esta memoria como un grupo éster que comprende un grupo saliente bueno, en donde el grupo éster carbonilo está unido a dicho grupo saliente bueno. Los grupos salientes buenos son conocidos por los expertos en la técnica. Además, se prefiere que el éster activado esté de acuerdo con la fórmula (9c), como se muestra a continuación, en donde R<sup>5</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en -N-succinimidilo (NHS), -N-sulfo-succinimidilo (sulfo-NHS), -(4-nitrofenilo), -pentafluorofenilo o -tetrafluorofenilo (TFP).

En otro aspecto, Q<sup>1</sup> es un grupo carbonato. Cuando Q<sup>1</sup> es un grupo carbonato, se prefiere que el grupo carbonato sea un grupo carbonato activado. Los grupos carbonato activados son conocidos por los expertos en la técnica. Un grupo carbonato activado se define en esta memoria como un grupo carbonato que comprende un grupo saliente bueno, en donde el grupo carbonilo del carbonato está unido a dicho grupo saliente bueno. Además, se prefiere que el grupo carbonato esté de acuerdo con la fórmula (9d), como se muestra a continuación, en donde R<sup>7</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en -N-succinimidilo, -N-sulfo-succinimidilo, -(4-nitrofenilo), -pentafluorofenilo o -tetrafluorofenilo.

En otro aspecto, Q<sup>1</sup> es un grupo sulfonil haluro de acuerdo con la fórmula (9e) como se muestra a continuación, en donde X se selecciona a partir del grupo que consiste en F, Cl, Br e I. Preferiblemente X es Cl o Br, más preferiblemente Cl.

5 En otra realización preferida, Q<sup>1</sup> es un grupo tiol (9f), o un derivado o un precursor de un grupo tiol. Un grupo tiol también puede denominarse un grupo mercapto. Cuando Q<sup>1</sup> es un derivado o un precursor de un grupo tiol, el derivado de tiol está preferiblemente de acuerdo con la fórmula (9g), (9h) o (9zb) como se muestra a continuación, en donde R<sup>8</sup> es un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub> opcionalmente sustituido o un grupo (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>, V es O o S y R<sup>16</sup> es un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub> opcionalmente sustituido. Más preferiblemente R<sup>8</sup> es un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido o un grupo (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>, e incluso más preferiblemente R<sup>8</sup> es metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo, t-butilo o fenilo. Aún más preferiblemente, R<sup>8</sup> es metilo o fenilo, lo más preferiblemente metilo. Más preferiblemente R<sup>16</sup> es un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, e incluso más preferiblemente R<sup>16</sup> es metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo o t-butilo, más preferiblemente metilo. Cuando Q<sup>1</sup> es un derivado de tiol de acuerdo con la fórmula (9g) o (9zb), y Q<sup>1</sup> reacciona con un grupo reactivo F<sup>1</sup> en una glicoproteína, dicho derivado de tiol se convierte en un grupo tiol durante el procedimiento. Cuando Q<sup>1</sup> está de acuerdo con la fórmula (9h), Q<sup>1</sup> es -SC(O)OR<sup>8</sup> o -SC(S)OR<sup>8</sup>, preferiblemente SC(O)OR<sup>8</sup>, en donde R<sup>8</sup>, y realizaciones preferidas del mismo, es como se ha definido anteriormente.

20 En otro aspecto, Q<sup>1</sup> es un grupo alqueno, en donde el grupo alqueno es lineal o ramificado, y en donde el grupo alqueno está opcionalmente sustituido. El grupo alqueno puede ser un grupo alqueno terminal o interno. El grupo alqueno puede comprender más de un doble enlace C - C, y si es así, comprende preferiblemente dos enlaces dobles C - C. Cuando el grupo alqueno es un grupo dienilo, se prefiere además que los dos enlaces dobles C - C estén separados por un enlace simple C - C (es decir, se prefiere que el grupo dienilo sea un grupo dienilo conjugado). Preferiblemente dicho grupo alqueno es un grupo alqueno C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, más preferiblemente un grupo alqueno C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>, e incluso más preferiblemente un grupo alqueno C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>. Además, se prefiere que el grupo alqueno sea un grupo alqueno terminal. Más preferiblemente, el grupo alqueno está de acuerdo con la fórmula (9i) como se muestra a continuación, en donde l es un número entero en el intervalo de 0 a 10, preferiblemente en el intervalo de 0 a 6, y p es un número entero en el intervalo de 0 a 10, preferiblemente de 0 a 6. Más preferiblemente, l es 0, 1, 2, 3 o 4, más preferiblemente l es 0, 1 o 2 y lo más preferiblemente l es 0 o 1. Más preferiblemente, p es 0, 1, 2, 3 o 4, más preferiblemente p es 0, 1 o 2 y lo más preferiblemente p es 0 o 1. Se prefiere particularmente que p sea 0 y l sea 0 o 1, o que p sea 1 y l sea 0 o 1.

30 En otra realización preferida, Q<sup>1</sup> es un grupo alquino, en donde el grupo alquino es lineal o ramificado, y en donde el grupo alquino está opcionalmente sustituido. El grupo alquino puede ser un grupo alquino terminal o interno. Preferiblemente, dicho grupo alquino es un grupo alquino C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, más preferiblemente un grupo alquino C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>, e incluso más preferiblemente un grupo alquino C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>. Además, se prefiere que el grupo alquino sea un grupo alquino terminal. Más preferiblemente, el grupo alquino está de acuerdo con la fórmula (9j) como se muestra a continuación, en donde l es un número entero en el intervalo de 0 a 10, preferiblemente en el intervalo de 0 a 6. Más preferiblemente, l es 0, 1, 2, 3 o 4, más preferiblemente l es 0, 1 o 2 y lo más preferiblemente l es 0 o 1.

40 En otro aspecto, Q<sup>1</sup> es un grupo cicloalqueno. El grupo cicloalqueno está opcionalmente sustituido. Preferiblemente dicho grupo cicloalqueno es un grupo cicloalqueno C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, más preferiblemente un grupo cicloalqueno C<sub>3</sub> - C<sub>12</sub>, e incluso más preferiblemente un grupo cicloalqueno C<sub>3</sub> - C<sub>8</sub>. En una realización preferida, el grupo cicloalqueno es un grupo *trans*-cicloalqueno, más preferiblemente un grupo *trans*-cicloocteno (también denominado grupo TCO) y lo más preferiblemente un grupo *trans*-cicloocteno de acuerdo con la fórmula (9zi) o (9zj) como se muestra más abajo. En otra realización preferida, el grupo cicloalqueno es un grupo ciclopropeno, en donde el grupo ciclopropeno está opcionalmente sustituido. En otra realización preferida, el grupo cicloalqueno es un grupo norborneno, un grupo oxanorborneno, un grupo norbornadieno o un grupo oxanorbornadieno, en donde el grupo norborneno, el grupo oxanorborneno, el grupo norbornadieno o un grupo oxanorbornadieno está opcionalmente sustituido. En una realización preferida adicional, el grupo cicloalqueno está de acuerdo con la fórmula (9k), (9l), (9m) o (9zc) como se muestra a continuación, en donde T es CH<sub>2</sub> u O, R<sup>9</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub> lineal o ramificado o un grupo (hetero)arilo C<sub>4</sub> - C<sub>12</sub>, y R<sup>19</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en hidrógeno e hidrocarburos fluorados. Preferiblemente, R<sup>9</sup> es independientemente hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>, más preferiblemente R<sup>9</sup> es independientemente hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>, incluso más preferiblemente R<sup>9</sup> es independientemente hidrógeno o metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo o t-butilo. Sin embargo, aún más preferiblemente R<sup>9</sup> es independientemente hidrógeno o metilo. En una realización preferida adicional, R<sup>19</sup> se selecciona a partir del grupo de hidrógeno y -CF<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>, -C<sub>3</sub>F<sub>7</sub> y -C<sub>4</sub>F<sub>9</sub>, más preferiblemente hidrógeno y -CF<sub>3</sub>. En una realización preferida adicional, el grupo cicloalqueno está de acuerdo con la fórmula (9k), en donde un R<sup>9</sup> es hidrógeno y el otro R<sup>9</sup> es un grupo metilo. En otra realización preferida adicional, el grupo cicloalqueno está de acuerdo con la fórmula (9l), en donde ambos R<sup>9</sup> son hidrogeno. En esas realizaciones, se prefiere adicionalmente que l sea 0 o 1. En otra realización preferida adicional, el grupo cicloalqueno es un grupo norborneno (T es CH<sub>2</sub>) o un grupo oxanorborneno (T es O) de acuerdo con la fórmula (9m), o un grupo norbornadieno (T es CH<sub>2</sub>) o un grupo oxanorbornadieno (T es O) de acuerdo con la fórmula (9zc), en donde R<sup>9</sup> es hidrógeno y R<sup>19</sup> es hidrógeno o -CF<sub>3</sub>, preferiblemente -CF<sub>3</sub>.

En otra realización preferida, Q<sup>1</sup> es un grupo (hetero)cicloalquino. El grupo (hetero)cicloalquino está opcionalmente

5 sustituido. Preferiblemente, el grupo (hetero)cicloalquinilo es un grupo (hetero)ciclooctinilo, es decir, un grupo heterociclooctilino o un grupo ciclooctinilo, en donde el grupo (hetero)ciclooctinilo está opcionalmente sustituido. En una realización preferida adicional, el grupo (hetero)ciclooctinilo está de acuerdo con la fórmula (9n), también denominado grupo DIBO, (9o), también denominado grupo DIBAC o (9p), también denominado grupo BARAC, o (9zk), también denominado grupo COMBO, todos ellos como se muestra a continuación, en donde U es O o NR<sup>9</sup>, y las realizaciones preferidas de R<sup>9</sup> son como se han definido anteriormente. Los anillos aromáticos en (9n) están opcionalmente O-sulfonilados en una o varias posiciones, mientras que los anillos de (9o) y (9p) se pueden halogenar en una o varias posiciones.

10 En una realización especialmente preferida, el átomo de nitrógeno fijado a R<sup>1</sup> en el compuesto (4b) es el átomo de nitrógeno en el anillo del grupo heterocicloalquino tal como el átomo de nitrógeno en (9o). En otras palabras, c, d y g son 0 en el compuesto (4b) y R<sup>1</sup> y Q<sup>1</sup>, junto con el átomo de nitrógeno al que están fijados, forman un grupo heterocicloalquino, preferiblemente un grupo heterociclooctino, lo más preferiblemente el grupo heterociclooctino de acuerdo con la fórmula (9o) o (9p). En esta memoria, el resto carbonilo de (9o) se reemplaza por el grupo sulfonilo del grupo de acuerdo con la fórmula (1). Alternativamente, el átomo de nitrógeno al que está fijado R<sup>1</sup> es el mismo átomo que el átomo designado como U en la fórmula (9n). En otras palabras, cuando Q<sup>1</sup> está de acuerdo con la fórmula (9n), U puede ser el átomo de nitrógeno derecho del grupo de acuerdo con la fórmula (1), o U = NR<sup>9</sup> y R<sup>9</sup> es el resto del grupo de acuerdo con la fórmula (1) y R<sup>1</sup> es el resto ciclooctino.

15 En otra realización preferida, Q<sup>1</sup> es un grupo biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo], opcionalmente sustituido, también denominado grupo BCN. Preferiblemente, el grupo biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo] está de acuerdo con la fórmula (9q) como se muestra más abajo.

20 En otra realización preferida, Q<sup>1</sup> es un grupo (hetero)dieno conjugado capaz de reaccionar en una reacción de Diels-Alder seleccionado a partir de grupos tetrazinilo opcionalmente sustituidos, grupos 1,2-quinona opcionalmente sustituidos y grupos triazina opcionalmente sustituidos. Más preferiblemente, dicho grupo tetrazinilo está de acuerdo con la fórmula (9r), como se muestra a continuación, en donde R<sup>9</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub> lineal o ramificado o un grupo (hetero)arilo C<sub>4</sub> - C<sub>12</sub>. Preferiblemente, R<sup>9</sup> es hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> o un grupo (hetero)arilo C<sub>4</sub> - C<sub>10</sub>, más preferiblemente R<sup>9</sup> es hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> o un grupo (hetero)arilo C<sub>4</sub> - C<sub>6</sub>. Incluso más preferiblemente R<sup>9</sup> es hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo, t-butilo o piridilo. Sin embargo, aún más preferiblemente, R<sup>9</sup> es hidrógeno, metilo o piridilo. Más preferiblemente, dicho grupo 1,2-quinona está de acuerdo con la fórmula (9zl) o (9zm). Dicho grupo triazina puede ser cualquier regioisómero. Más preferiblemente, dicho grupo triazina es un grupo 1,2,3-triazina o un grupo 1,2,4-triazina, que se puede fijar a través de cualquier posición posible, como se indica en la fórmula (9zn). La 1,2,3-triazina es la más preferida como grupo triazina.

25 En otra realización preferida, Q<sup>1</sup> es un grupo azido de acuerdo con la fórmula (9s) como se muestra más abajo.

30 En otra realización preferida, Q<sup>1</sup> es un grupo triarilfosfina, opcionalmente sustituido, que es adecuado para realizar una reacción de ligación de Staudinger. Preferiblemente, el grupo fosfina está de acuerdo con la fórmula (9t) como se muestra a continuación, en donde R<sup>10</sup> es hidrógeno o un grupo (tio)éster. Cuando R<sup>10</sup> es un grupo (tio)éster, se prefiere que R<sup>10</sup> sea -C(O)-V-R<sup>11</sup>, en donde V es O o S y R<sup>11</sup> es un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub>. Preferiblemente, R<sup>11</sup> es un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>, más preferiblemente un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>. Lo más preferiblemente, R<sup>11</sup> es un grupo metilo.

35 En otro aspecto, Q<sup>1</sup> es un grupo de óxido de nitrilo de acuerdo con la fórmula (9u) como se muestra más abajo.

40 En otro aspecto, Q<sup>1</sup> es un grupo nitrona. Preferiblemente, el grupo nitrona está de acuerdo con la fórmula (9v) como se muestra a continuación, en donde R<sup>12</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub> lineales o ramificados y grupos arilo C<sub>6</sub> - C<sub>12</sub>. Preferiblemente, R<sup>12</sup> es un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>, más preferiblemente R<sup>12</sup> es un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>. Incluso más preferiblemente R<sup>12</sup> es metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo o t-butilo. Sin embargo, aún más preferiblemente R<sup>12</sup> es metilo.

45 En otro aspecto, Q<sup>1</sup> es un grupo nitrilo imina. Preferiblemente, el grupo nitrilo imina está de acuerdo con la fórmula (9w) o (9zd) como se muestra a continuación, en donde R<sup>13</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub> lineales o ramificados y grupos arilo C<sub>6</sub> - C<sub>12</sub>. Preferiblemente, R<sup>13</sup> es un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>, más preferiblemente R<sup>13</sup> es un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>. Incluso más preferiblemente R<sup>13</sup> es metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo o t-butilo. Sin embargo, aún más preferiblemente R<sup>13</sup> es metilo.

50 En otro aspecto, Q<sup>1</sup> es un grupo diazo. Preferiblemente, el grupo diazo está de acuerdo con la fórmula (9x) como se muestra a continuación, en donde R<sup>14</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en hidrógeno o un derivado carbonilo. Más preferiblemente, R<sup>14</sup> es hidrogeno.

55 En otro aspecto, Q<sup>1</sup> es un grupo cetona. Más preferiblemente, el grupo cetona está de acuerdo con la fórmula (9y) como se muestra a continuación, en donde R<sup>15</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub> lineales o ramificados y grupos arilo C<sub>6</sub> - C<sub>12</sub>. Preferiblemente, R<sup>15</sup> es un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>, más preferiblemente R<sup>15</sup> es un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>. Incluso más preferiblemente R<sup>15</sup> es metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo o t-butilo. Sin embargo, aún más preferiblemente R<sup>15</sup> es metilo.

En otro aspecto, Q<sup>1</sup> es un grupo (O-alquil)hidroxilamino. Más preferiblemente, el grupo (O-alquil)hidroxilamino está de acuerdo con la fórmula (9z) como se muestra más abajo.

En otro aspecto, Q<sup>1</sup> es un grupo hidrazina. Preferiblemente, el grupo hidrazina está de acuerdo con la fórmula (9za) como se muestra más abajo.

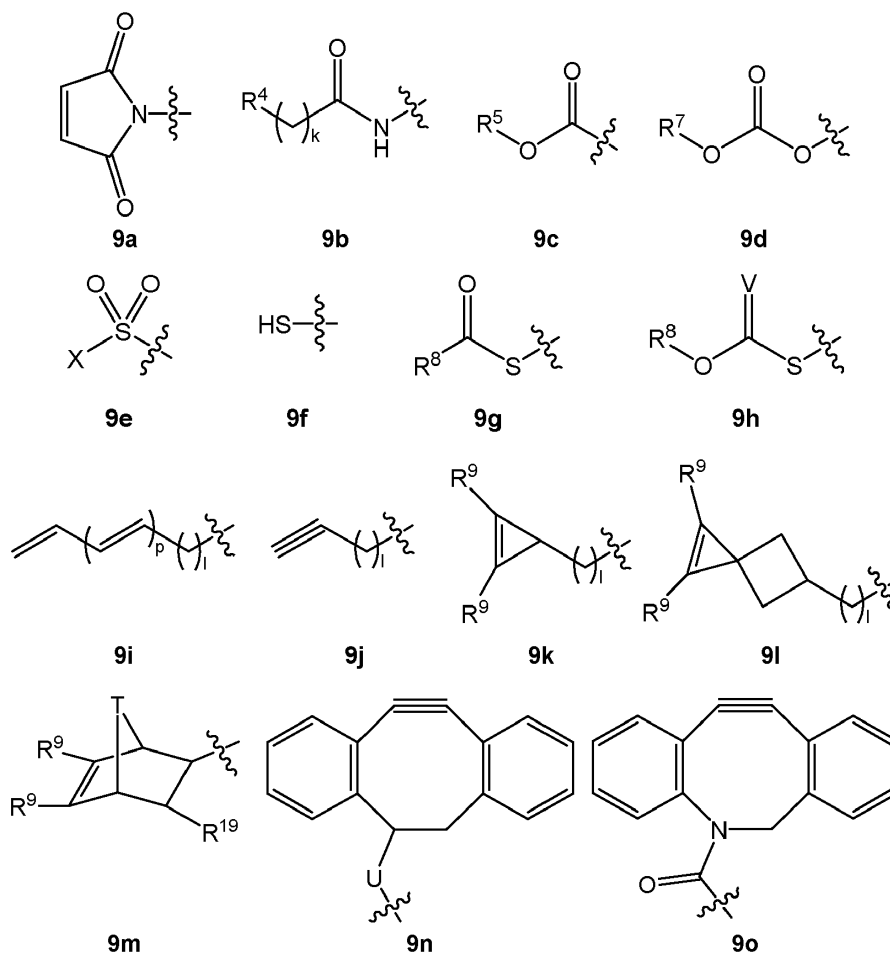
- 5 En otro aspecto, Q<sup>1</sup> es un grupo N-maleimidilo halogenado o un grupo N-maleimidilo sulfonilado. Cuando Q<sup>1</sup> es un grupo N-maleimidilo halogenado o sulfonilado, Q<sup>1</sup> está preferiblemente de acuerdo con la fórmula (9ze) como se muestra a continuación, en donde R<sup>6</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno F, Cl, Br, I y -S(O)<sub>2</sub>R<sup>18</sup>, en donde R<sup>18</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub> opcionalmente sustituidos y grupos (hetero)arilo C<sub>4</sub> - C<sub>12</sub>, y con la condición de que al menos un R<sup>6</sup> no es hidrógeno.
- 10 Cuando R<sup>6</sup> es halógeno (es decir, cuando R<sup>6</sup> es F, Cl, Br o I), se prefiere que R<sup>6</sup> sea Br. Cuando R<sup>6</sup> es -S(O)<sub>2</sub>R<sup>18</sup>, se prefiere que R<sup>18</sup> sea un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> o un grupo (hetero)arilo C<sub>4</sub> - C<sub>6</sub>, preferiblemente un grupo fenilo.

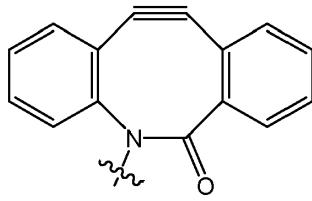
En otro aspecto, Q<sup>1</sup> es un grupo carbonil haluro de acuerdo con la fórmula (9zf) como se muestra a continuación, en donde X se selecciona a partir del grupo que consiste en F, Cl, Br e I. Preferiblemente, X es Cl o Br, y más preferiblemente, X es Cl.

- 15 En otro aspecto, Q<sup>1</sup> es un grupo alenamida de acuerdo con la fórmula (9zg).

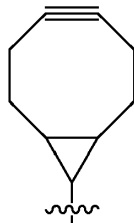
En otra realización preferida, Q<sup>1</sup> es un grupo 1,1-bis(sulfonilmetil)metilcarbonilo de acuerdo con la fórmula (9zh), o un derivado por eliminación del mismo, en donde R<sup>18</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub> opcionalmente sustituidos y grupos (hetero)arilo C<sub>4</sub> - C<sub>12</sub>. Más preferiblemente, R<sup>18</sup> es un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido o un grupo (hetero)arilo C<sub>4</sub> - C<sub>6</sub>, y lo más preferiblemente un grupo fenilo.

20

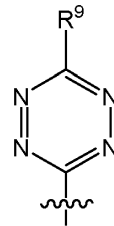




9p



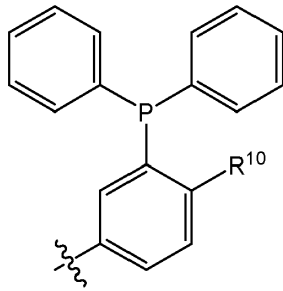
9q



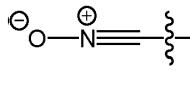
9r



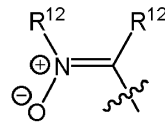
9s



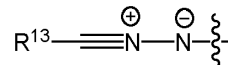
9t



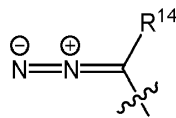
9u



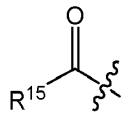
9v



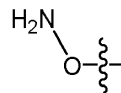
9w



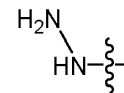
9x



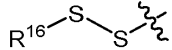
9y



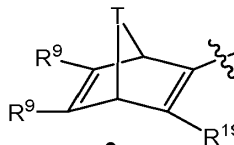
9z



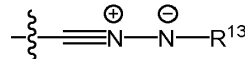
9za



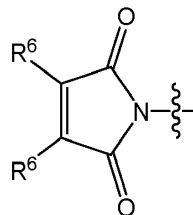
9zb



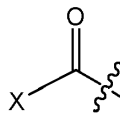
9zc



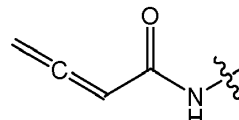
9zd



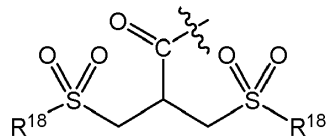
9ze



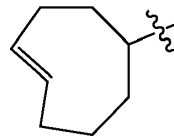
9zf



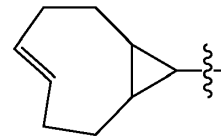
9zg



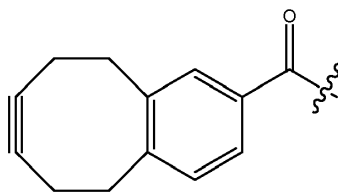
9zh



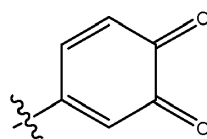
9zi



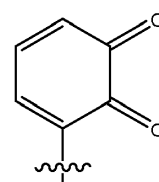
9zj



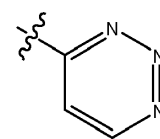
9zk



9zl



9zm



9zn

en donde k, l, X, T, U, V, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup>, R<sup>13</sup>, R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup>, R<sup>16</sup>, R<sup>17</sup>, R<sup>18</sup> y R<sup>19</sup> son como se han definido anteriormente.

En una realización preferida del procedimiento de conjugación de acuerdo con la invención tal y como se describe a continuación, la conjugación se realiza a través de una cicloadición, tal como una reacción de Diels-Alder o una cicloadición 1,3-dipolar, preferiblemente la cicloadición 1,3-dipolar. De acuerdo con esta realización, el grupo reactivo Q<sup>1</sup> (así como F<sup>1</sup> en la glicoproteína) se selecciona a partir de grupos reactivos en una reacción de cicloadición. En esta memoria, los grupos reactivos Q<sup>1</sup> y F<sup>1</sup> son complementarios, es decir, son capaces de reaccionar entre sí en una reacción de cicloadición.

Para una reacción de Diels-Alder, uno entre F<sup>1</sup> y Q<sup>1</sup> es un dieno y el otro entre F<sup>1</sup> y Q<sup>1</sup> es un dienófilo. Según lo apreciado por una persona experta, el término "dieno" en el contexto de la reacción de Diels-Alder se refiere a 1,3-(hetero)dienos, e incluye dienos conjugados (R<sub>2</sub>C=CR-CR=CR<sub>2</sub>), iminas (por ejemplo, R<sub>2</sub>C=CR-N=CR<sub>2</sub> o R<sub>2</sub>C=CR-CR=NR, R<sub>2</sub>C=N-N=CR<sub>2</sub>) y carbonilos (por ejemplo, R<sub>2</sub>C=CR-CR=O u O=CR-CR=O). Las reacciones de hetero-Diels-Alder con dienos que contienen N y O son conocidas en la técnica. Cualquier dieno conocido en la técnica por ser adecuado para las reacciones de Diels-Alder, se puede usar como grupo reactivo Q<sup>1</sup> o F<sup>1</sup>. Los dienos preferidos incluyen tetrazinas como se han descrito anteriormente, 1,2-quinonas como se han descrito anteriormente y triazinas como se han descrito anteriormente. Aunque cualquier dienófilo conocido en la técnica por ser adecuado para las reacciones de Diels-Alder se puede emplear como grupo reactivo Q<sup>1</sup> o F<sup>1</sup>, el dienófilo es preferiblemente un grupo alqueno o alquino tal y como se ha descrito anteriormente, lo más preferiblemente un grupo alquino. Para la conjugación a través de una reacción de Diels-Alder, se prefiere que F<sup>1</sup> sea el dieno y Q<sup>1</sup> sea el dienófilo. En esta memoria, cuando Q<sup>1</sup> es un dieno, F<sup>1</sup> es un dienófilo y cuando Q<sup>1</sup> es un dienófilo, F<sup>1</sup> es un dieno. Lo más preferiblemente, Q<sup>1</sup> es un dienófilo, preferentemente Q<sup>1</sup> es o comprende un grupo alquínico, y F<sup>1</sup> es un dieno, preferiblemente un grupo tetrazina, 1,2-quinona o triazina.

Para una cicloadición 1,3-dipolar, uno entre F<sup>1</sup> y Q<sup>1</sup> es un dipolo 1,3 y el otro entre F<sup>1</sup> y Q<sup>1</sup> es un dipolarófilo. Cualquier dipolo 1,3 conocido en la técnica que sea adecuado para cicloadiciones 1,3-dipolares puede usarse como grupo reactivo Q<sup>1</sup> o F<sup>1</sup>. Los dipolos 1,3 preferidos incluyen grupos azido, grupos nitrona, grupos óxido de nitrilo, grupos nitrilo imina y grupos diazo. Aunque cualquier dipolarófilo conocido en la técnica que sea adecuado para cicloadiciones 1,3-dipolares puede usarse como grupo reactivo Q<sup>1</sup> o F<sup>1</sup>, el dipolarófilo es preferiblemente un grupo alqueno o alquino, lo más preferiblemente un grupo alquino. Para la conjugación a través de una cicloadición 1,3-dipolar, se prefiere que F<sup>1</sup> sea el dipolo 1,3 y Q<sup>1</sup> el dipolarófilo. En esta memoria, cuando Q<sup>1</sup> es un dipolo 1,3, F<sup>1</sup> es un dipolarófilo y cuando Q<sup>1</sup> es un dipolarófilo, F<sup>1</sup> es un dipolo 1,3. Lo más preferiblemente, Q<sup>1</sup> es un dipolarófilo, preferentemente Q<sup>1</sup> es o comprende un grupo alquínico, y F<sup>1</sup> es un dipolo 1,3, preferiblemente un grupo azido.

Por tanto, en una realización preferida, Q<sup>1</sup> se selecciona a partir de dipolarófilos y dienófilos. Preferiblemente, Q<sup>1</sup> es un grupo alqueno o alquino. En una realización especialmente preferida, Q<sup>1</sup> comprende un grupo alquino, preferiblemente seleccionado a partir del grupo alquínico como se ha descrito anteriormente, el grupo cicloalquénico como se ha descrito anteriormente, el grupo (hetero)cicloalquínico como se ha descrito anteriormente y un grupo biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo], más preferiblemente Q<sup>1</sup> se selecciona a partir de las fórmulas (9j), (9n), (9o), (9p), (9q) y (9zk), como se ha definido anteriormente y se muestra a continuación, se selecciona más preferiblemente a partir de las fórmulas (9n), (9o), (9p), (9q) y (9zk). Lo más preferiblemente, Q<sup>1</sup> es un grupo biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo], preferiblemente de fórmula (9q). Se sabe que esos grupos son altamente efectivos en la conjugación con glicoproteínas funcionalizadas con azida como se describe en esta memoria, y cuando el enlazador de sulfamida de acuerdo con la invención se emplea en tales enlazadores-conjugados y bioconjugados, cualquier agregación se reduce al mínimo de manera beneficiosa. El enlazador de sulfamida de acuerdo con la invención proporciona una reducción significativa de la agregación, especialmente para tales grupos reactivos hidrófobos de Q<sup>1</sup>, y para los bioconjugados conjugados.

Como se ha descrito anteriormente, en el compuesto de acuerdo con la invención, Q<sup>1</sup> es capaz de reaccionar con un grupo reactivo F<sup>1</sup> que está presente en una glicoproteína. Los grupos reactivos F<sup>1</sup> complementarios para el grupo reactivo Q<sup>1</sup> son conocidos por los expertos en la materia, y se describen con más detalle a continuación. Algunos ejemplos representativos de una reacción entre F<sup>1</sup> y Q<sup>1</sup> y sus productos correspondientes se muestran en la Figura 22.

Como se ha descrito anteriormente, la molécula diana D y el grupo reactivo Q<sup>1</sup> están fijados covalentemente al enlazador con el enlazador-conjugado de acuerdo con la invención. La fijación covalente de una molécula diana D con el enlazador puede tener lugar, por ejemplo, a través de la reacción de un grupo funcional F<sup>2</sup> presente en la molécula diana con un grupo reactivo Q<sup>2</sup> presente en el enlazador. Las reacciones orgánicas adecuadas para la fijación de una molécula diana D a un enlazador son conocidas por los expertos en la técnica, al igual que los grupos funcionales F<sup>2</sup> que son complementarios a un grupo reactivo Q<sup>2</sup>. En consecuencia, D puede estar fijada al enlazador a través de un grupo de conexión Z.

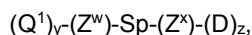
La expresión "grupo de conexión" en esta memoria se refiere al elemento estructural que conecta una parte de un compuesto y otra parte del mismo compuesto. Como entenderá el experto en la materia, la naturaleza de un grupo de conexión depende del tipo de reacción orgánica con la que se ha obtenido la conexión entre las partes de dicho compuesto. A modo de ejemplo, cuando el grupo carboxilo de R-C(O)-OH reacciona con el grupo amino de H<sub>2</sub>N-R'

para formar R-C(O)-N(H)-R', R está conectado con R' a través del grupo de conexión Z, y Z puede estar representado por el grupo -C(O)-N(H)-.

El grupo reactivo Q<sup>1</sup> se puede fijar al enlazador de manera similar. En consecuencia, Q<sup>1</sup> se puede fijar al resto espaciador a través de un grupo de conexión Z.

- 5 Se conocen numerosas reacciones en la técnica para la fijación de una molécula diana a un enlazador, y para la fijación de un grupo reactivo Q<sup>1</sup> a un enlazador. En consecuencia, una amplia variedad de grupos de conexión Z puede estar presente en el enlazador-conjugado de acuerdo con la invención.

Por tanto, la invención también se refiere a un compuesto de acuerdo con la fórmula:



- 10 en donde:

y es un número entero en el intervalo de 1 a 10;

z es un número entero en el intervalo de 1 a 10;

Q<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en un grupo N-maleimidilo opcionalmente sustituido, un grupo (hetero)cicloalquinilo y un grupo biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo];

- 15 D es una molécula diana seleccionada a partir del grupo que consiste en un fármaco, un profármaco, un agente de diagnóstico, una proteína, un péptido, un polipéptido, un marcador peptídico, un aminoácido, un glicano, un lípido, una vitamina, un esteroide, un nucleótido, un nucleósido, un polinucleótido, un ARN, un ADN, una molécula informadora, un polímero, una superficie sólida, un hidrogel, una nanopartícula, una micropartícula y una biomolécula;

- 20 Sp es un resto espaciador, en donde un resto espaciador se define como un resto que separa (es decir, proporciona una cierta distancia entre) y se une covalentemente al grupo reactivo Q<sup>1</sup> y a la molécula diana D;

Z<sup>w</sup> es un grupo de conexión que conecta el grupo reactivo Q<sup>1</sup> con dicho resto espaciador;

- 25 Z<sup>x</sup> es un grupo de conexión que conecta la molécula diana D con dicho resto espaciador; y en donde dicho resto espaciador comprende un grupo de acuerdo con la Fórmula (1) o una de sus sales, en donde el grupo de acuerdo con la Fórmula (1) es como se ha definido anteriormente.

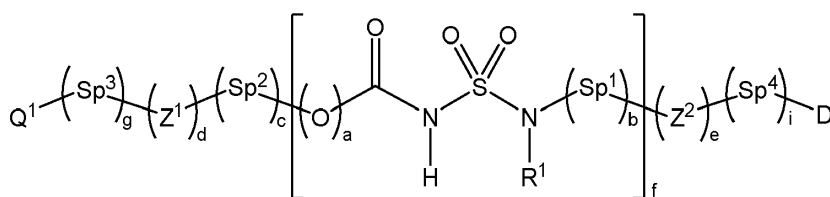
En una realización preferida, a en el grupo de acuerdo con la fórmula (1) es 0. En otra realización preferida, a en el grupo de acuerdo con la fórmula (1) es 1.

- 30 Las realizaciones preferidas para y y z son como se han definido anteriormente para (Q<sup>1</sup>)<sub>y</sub>-Sp-(D)<sub>z</sub>. Además, se prefiere que el compuesto esté de acuerdo con la fórmula Q<sup>1</sup>-(Z<sup>w</sup>)-Sp-(Z<sup>x</sup>)-(D)<sub>4</sub>, Q<sup>1</sup>-(Z<sup>w</sup>)-Sp-(Z<sup>x</sup>)-(D)<sub>3</sub>, Q<sup>1</sup>-(Z<sup>w</sup>)-Sp-(Z<sup>x</sup>)-(D)<sub>2</sub> o Q<sup>1</sup>-(Z<sup>w</sup>)-Sp-(Z<sup>x</sup>)-D, más preferiblemente Q<sup>1</sup>-(Z<sup>w</sup>)-Sp-(Z<sup>x</sup>)-(D)<sub>2</sub> o Q<sup>1</sup>-(Z<sup>w</sup>)-Sp-(Z<sup>x</sup>)-D y lo más preferiblemente Q<sup>1</sup>-(Z<sup>w</sup>)-Sp-(Z<sup>x</sup>)-D, en donde Z<sup>w</sup> y Z<sup>x</sup> son como se han definido anteriormente.

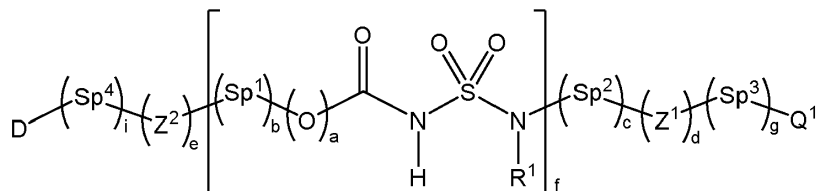
- 35 Preferiblemente, Z<sup>w</sup> y Z<sup>x</sup> se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en -O-, -S-, -NR<sup>2</sup>-, -N=N-, -C(O)-, -C(O)-NR<sup>2</sup>-, -O-C(O)-, -O-C(O)-O-, -O-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-C(O)-, -NR<sup>2</sup>-C(O)-O-, -NR<sup>2</sup>-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -S-C(O)-, -S-C(O)-O-, -S-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -O-S(O)<sub>2</sub>-, -O-S(O)<sub>2</sub>-O-, -O-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>2</sup>-, -O-S(O)-, -O-S(O)-O-, -O-S(O)-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-C(O)-, -O-NR<sup>2</sup>-C(O)-O-, -O-NR<sup>2</sup>-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-O-C(O)-, -NR<sup>2</sup>-O-C(O)-O-, -NR<sup>2</sup>-O-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-C(S)-, -O-NR<sup>2</sup>-C(S)-O-, -O-NR<sup>2</sup>-C(S)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-O-C(S)-, -NR<sup>2</sup>-O-C(S)-O-, -NR<sup>2</sup>-O-C(S)-NR<sup>2</sup>-, -O-C(S)-, -O-C(S)-O-, -O-C(S)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-C(S)-, -NR<sup>2</sup>-C(S)-O-, -NR<sup>2</sup>-C(S)-NR<sup>2</sup>-, -S-S(O)<sub>2</sub>-, -S-S(O)<sub>2</sub>-O-, -S-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)-O-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)<sub>2</sub>-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)<sub>2</sub>-O-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)-O-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)<sub>2</sub>-O-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)<sub>2</sub>-, -O-P(O)(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub>-, -S-P(O)(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub>-, -NR<sup>2</sup>-P(O)(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub>- y combinaciones de dos o más de los mismos, en donde R<sup>2</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquenilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquinilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub> y grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, en donde los grupos alquilo, los grupos alquenilo, los grupos alquinilo y los grupos cicloalquilo están opcionalmente sustituidos.

Realizaciones preferidas para D y Q<sup>1</sup> son como se han definido anteriormente.

- 45 Más particularmente, la presente invención se refiere a un compuesto de acuerdo con la fórmula (4a) o (4b), o una de sus sales:



4a



4b

en donde:

a es independientemente 0 o 1;

5 b es independientemente 0 o 1;

c es 0 o 1;

d es 0 o 1;

e es 0 o 1;

f es un número entero en el intervalo de 1 a 150;

10 g es 0 o 1;

i es 0 o 1;

15 D es una molécula diana seleccionada a partir del grupo que consiste en un fármaco, un profármaco, un agente de diagnóstico, una proteína, un péptido, un polipéptido, un marcador peptídico, un aminoácido, un glicano, un lípido, una vitamina, un esteroide, un nucleótido, un nucleósido, un polinucleótido, un ARN, un ADN, una molécula informadora, un polímero, una superficie sólida, un hidrogel, una nanopartícula, una micropartícula y una biomolécula;

Q<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en un grupo N-maleimidilo opcionalmente sustituido, un grupo (hetero)cicloalquilino y un grupo biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo];

Sp<sup>1</sup> es un resto espaciador;

20 Sp<sup>2</sup> es un resto espaciador;

Sp<sup>3</sup> es un resto espaciador;

Sp<sup>4</sup> es un resto espaciador;

Z<sup>1</sup> es un grupo de conexión que conecta Q<sup>1</sup> o Sp<sup>3</sup> con Sp<sup>2</sup>, O o C(O) o N(R<sup>1</sup>);

Z<sup>2</sup> es un grupo de conexión que conecta D o Sp<sup>4</sup> con Sp<sup>1</sup>, N(R<sup>1</sup>), O o C(O); y

25 R<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, los grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir de O, S y NR<sup>3</sup> en donde R<sup>3</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>; o

30 R<sup>1</sup> es D, -(Sp<sup>1</sup>)<sub>b</sub>-(Z<sup>2</sup>)<sub>e</sub>-(Sp<sup>4</sup>)<sub>i</sub>-D] o -(Sp<sup>2</sup>)<sub>c</sub>-(Z<sup>1</sup>)<sub>d</sub>-(Sp<sup>3</sup>)<sub>g</sub>-Q<sup>1</sup>], en donde Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup>, Sp<sup>4</sup>, Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup>, D, Q<sup>1</sup>, b, c, d, e, g e i son como se han definido anteriormente.

El compuesto de acuerdo con la fórmula (4a) o (4b), o una de sus sales, también puede denominarse un enlazador-conjugado.



En una realización preferida, a es 1 en el compuesto de acuerdo con la fórmula (4a) o (4b). En otra realización preferida, a es 0 en el compuesto de acuerdo con la fórmula (4a) o (4b).

5 Tal y como se ha definido anteriormente, Z<sup>1</sup> es un grupo de conexión que conecta Q<sup>1</sup> o Sp<sup>3</sup> con Sp<sup>2</sup>, O o C(O) o N(R<sup>1</sup>), y Z<sup>2</sup> es un grupo de conexión que conecta D o Sp<sup>4</sup> con Sp<sup>1</sup>, N(R<sup>1</sup>), O o C(O). Como se ha descrito con más detalle anteriormente, la expresión "grupo de conexión" se refiere a un elemento estructural que conecta una parte de un compuesto y otra parte del mismo compuesto.

10 En un compuesto de acuerdo con la fórmula (4a), el grupo de conexión Z<sup>1</sup>, cuando está presente (es decir, cuando d es 1), conecta Q<sup>1</sup> (opcionalmente a través de un resto espaciador Sp<sup>3</sup>) con el átomo de O o con el grupo C(O) del compuesto de acuerdo con la fórmula (4a), opcionalmente a través de un resto espaciador Sp<sup>2</sup>. Más particularmente, cuando Z<sup>1</sup> está presente (es decir, d es 1), y cuando Sp<sup>3</sup> y Sp<sup>2</sup> están ausentes (es decir, g es 0 y c es 0), Z<sup>1</sup> conecta Q<sup>1</sup> con el átomo de O (a es 1) o con el grupo C(O) (a es 0) del enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4a). Cuando Z<sup>1</sup> está presente (es decir, cuando d es 1), Sp<sup>3</sup> está presente (es decir, g es 1) y Sp<sup>2</sup> está ausente (es decir, c es 0), Z<sup>1</sup> conecta el resto espaciador Sp<sup>3</sup> con el átomo de O (a es 1) o con el grupo C(O) (a es 0) del enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4a). Cuando Z<sup>1</sup> está presente (es decir, d es 1), y cuando Sp<sup>3</sup> y Sp<sup>2</sup> están presentes (es decir, g es 1 y c es 1), Z<sup>1</sup> conecta el resto espaciador Sp<sup>3</sup> con el resto espaciador Sp<sup>2</sup> del enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4a). Cuando Z<sup>1</sup> está presente (es decir, cuando d es 1), Sp<sup>3</sup> está ausente (es decir, g es 0) y Sp<sup>2</sup> está presente (es decir, c es 1), Z<sup>1</sup> conecta Q<sup>1</sup> con el resto espaciador Sp<sup>2</sup> del enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4a).

20 En un compuesto de acuerdo con la fórmula (4b), el grupo de conexión Z<sup>1</sup>, cuando está presente (es decir, cuando d es 1), conecta Q<sup>1</sup> (opcionalmente a través de un resto espaciador Sp<sup>3</sup>) con el átomo de N del grupo N(R<sup>1</sup>) en el enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4b), opcionalmente a través de un resto espaciador Sp<sup>2</sup>. Más particularmente, cuando Z<sup>1</sup> está presente (es decir, d es 1), y cuando Sp<sup>3</sup> y Sp<sup>2</sup> están ausentes (es decir, g es 0 y c es 0), Z<sup>1</sup> conecta Q<sup>1</sup> con el átomo de N del grupo N(R<sup>1</sup>) del enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4b). Cuando Z<sup>1</sup> está presente (es decir, cuando d es 1), Sp<sup>3</sup> está presente (es decir, g es 1) y Sp<sup>2</sup> está ausente (es decir, c es 0), Z<sup>1</sup> conecta el resto espaciador Sp<sup>3</sup> con el átomo de N del grupo N(R<sup>1</sup>) del enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4b). Cuando Z<sup>1</sup> está presente (es decir, d es 1), y cuando Sp<sup>3</sup> y Sp<sup>2</sup> están presentes (es decir, g es 1 y c es 1), Z<sup>1</sup> conecta el resto espaciador Sp<sup>3</sup> con el resto espaciador Sp<sup>2</sup> del enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4b). Cuando Z<sup>1</sup> está presente (es decir, cuando d es 1), Sp<sup>3</sup> está ausente (es decir, g es 0) y Sp<sup>2</sup> está presente (es decir, c es 1), Z<sup>1</sup> conecta Q<sup>1</sup> con el resto espaciador Sp<sup>2</sup> del enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4b).

En el compuesto de acuerdo con la fórmula (4a), cuando c, d y g son todos 0, entonces Q<sup>1</sup> está fijado directamente al átomo de O (cuando a es 1) o al grupo C(O) (cuando a es 0) del enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4a).

35 En el compuesto de acuerdo con la fórmula (4b), cuando c, d y g son todos 0, entonces Q<sup>1</sup> está fijado directamente al átomo de N del grupo N(R<sup>1</sup>) del enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4b).

40 En un compuesto de acuerdo con la fórmula (4a), el grupo de conexión Z<sup>2</sup>, cuando está presente (es decir, cuando e es 1), conecta D (opcionalmente a través de un resto espaciador Sp<sup>4</sup>) con el átomo de N del grupo N(R<sup>1</sup>) en el enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4a), opcionalmente a través de un resto espaciador Sp<sup>1</sup>. Más particularmente, cuando Z<sup>2</sup> está presente (es decir, e es 1), y cuando Sp<sup>1</sup> y Sp<sup>4</sup> están ausentes (es decir, b es 0 e i es 0), Z<sup>2</sup> conecta D con el átomo de N del grupo N(R<sup>1</sup>) del enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4a). Cuando Z<sup>2</sup> está presente (es decir, cuando e es 1), Sp<sup>4</sup> está presente (es decir, i es 1) y Sp<sup>1</sup> está ausente (es decir, b es 0), Z<sup>2</sup> conecta el resto espaciador Sp<sup>4</sup> con el átomo de N del grupo N(R<sup>1</sup>) del enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4a). Cuando Z<sup>2</sup> está presente (es decir, e es 1), y cuando Sp<sup>1</sup> y Sp<sup>4</sup> están presentes (es decir, b es 1 e i es 1), Z<sup>2</sup> conecta el resto espaciador Sp<sup>1</sup> con el resto espaciador Sp<sup>4</sup> del enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4a). Cuando Z<sup>2</sup> está presente (es decir, cuando e es 1), Sp<sup>4</sup> está ausente (es decir, i es 0) y Sp<sup>1</sup> está presente (es decir, b es 1), Z<sup>2</sup> conecta D con el resto espaciador Sp<sup>1</sup> del enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4a).

En el compuesto de acuerdo con la fórmula (4a), cuando b, e e i son todos 0, entonces D se fija directamente al átomo de N del grupo N(R<sup>1</sup>) del enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4a).

50 En el compuesto de acuerdo con la fórmula (4b), cuando b, e e i son todos 0, entonces D se fija directamente al átomo de O (cuando a es 1) o al grupo C(O) (cuando a es 0) del enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4b).

55 Como entenderá el experto en la materia, la naturaleza de un grupo de conexión depende del tipo de reacción orgánica con la que se ha obtenido la conexión entre las partes específicas de dicho compuesto. Se dispone de una gran cantidad de reacciones orgánicas para conectar un grupo reactivo Q<sup>1</sup> con un resto espaciador, y para conectar una molécula diana con un resto espaciador. En consecuencia, existe una gran variedad de grupos de conexión Z<sup>1</sup> y Z<sup>2</sup>.

En una realización preferida del enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4a) y (4b), Z<sup>1</sup> y Z<sup>2</sup> se seleccionan

independientemente a partir del grupo que consiste en -O-, -S-, -S-S-, -NR<sup>2</sup>-, -N=N-, -C(O)-, -C(O)-NR<sup>2</sup>-, -O-C(O)-, -O-C(O)-O-, -O-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sub>2</sub>-C(O)-, -NR<sup>2</sup>-C(O)-O-, -NR<sup>2</sup>-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -S-C(O)-, -S-C(O)-O-, -S-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -O-S(O)<sub>2</sub>-, -O-S(O)<sub>2</sub>-O-, -O-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>2</sup>-, -O-S(O)-, -O-S(O)-O-, -O-S(O)-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-C(O)-, -O-NR<sup>2</sup>-C(O)-O-, -O-NR<sup>2</sup>-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-O-C(O)-, -NR<sup>2</sup>-O-C(O)-O-, -NR<sup>2</sup>-O-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-C(S)-, -O-NR<sup>2</sup>-C(S)-O-, -O-NR<sup>2</sup>-C(S)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-O-C(S)-, -NR<sup>2</sup>-O-C(S)-O-, -NR<sup>2</sup>-O-C(S)-NR<sup>2</sup>-, -O-C(S)-, -O-C(S)-O-, -O-C(S)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-C(S)-, -NR<sup>2</sup>-C(S)-O-, -NR<sup>2</sup>-C(S)-NR<sup>2</sup>-, -S-S(O)<sub>2</sub>-, -S-S(O)<sub>2</sub>-O-, -S-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)-O-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)<sub>2</sub>-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)-O-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)<sub>2</sub>-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)<sub>2</sub>-, -O-P(O)(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub>-, -S-P(O)(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub>-, -NR<sup>2</sup>-P(O)(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub>- y combinaciones de dos o más de los mismos, en donde R<sup>2</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquenilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquinilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub> y grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, los grupos alquilo, grupos alquenilo, grupos alquinilo y grupos cicloalquilo están opcionalmente sustituidos.

Como se ha descrito anteriormente, en el compuesto de acuerdo con la fórmula (4a) o (4b), Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup> y Sp<sup>4</sup> son restos espaciadores. Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup> y Sp<sup>4</sup> pueden estar, independientemente, ausentes o presentes (b, c, g e i son, independientemente, 0 o 1). Sp<sup>1</sup>, si está presente, puede ser diferente de Sp<sup>2</sup> si está presente, de Sp<sup>3</sup> y/o de Sp<sup>4</sup>, si está presente.

Los restos espaciadores son conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de restos espaciadores adecuados incluyen diaminas de polietilenglicol (por ejemplo, 1,8-diamino-3,6-dioxaoctano o equivalentes que comprenden cadenas de etilenglicol más largas), cadenas de polietilenglicol o cadenas de poli(óxido de etileno), cadenas de polipropilenglicol o cadenas de poli(óxido de propileno) y 1,x-diaminoalcanos, en donde x es el número de átomos de carbono en el alcano.

Otra clase de restos espaciadores adecuados comprende restos espaciadores escindibles o enlazadores escindibles. Los enlazadores escindibles son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo Shabat et al., *Soft Matter* 2012, 6, 1073, describe enlazadores escindibles que comprenden restos autoinmolativos que se liberan después de un desencadenante biológico, p. ej., una escisión enzimática o un evento de oxidación. Algunos ejemplos de enlazadores escindibles adecuados son los enlazadores de disulfuro que se escinden después de una reducción, los enlazadores peptídicos que se escinden después de un reconocimiento específico por una proteasa, p. ej., catepsina, plasmina o metaloproteasas, o enlazadores basados en glicósidos que se escinden después de un reconocimiento específico por una glicosidasa, p. ej., glucoronidasa, o nitroaromáticos que se reducen en áreas hipóxicas pobres en oxígeno. En esta memoria, los restos espaciadores escindibles adecuados también incluyen restos espaciadores que comprenden una secuencia de aminoácidos específica, escindible. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, restos espaciadores que comprenden un resto Val-Cit (valina-citulina). Los bioconjugados que contienen un enlazador escindible, como el enlazador Val-Cit, en particular el Val-Cit-PABC, experimentan una agregación considerable debido a su limitada solubilidad en agua. Para tales bioconjugados, la incorporación del enlazador de sulfamida de acuerdo con la invención es particularmente beneficiosa. Además, las reacciones de conjugación con un enlazador-conjugado que comprende un enlazador escindible se ven obstaculizadas por la limitada solubilidad en agua del enlazador-conjugado. Por lo tanto, los enlazadores-conjugados que comprenden un enlazador escindible, como el enlazador Val-Cit, en particular Val-Cit-PABC, y el enlazador de sulfamida de acuerdo con la invención, superan a los enlazadores-conjugados que comprenden un enlazador escindible de ese tipo pero que carecen de ese enlazador de sulfamida en la conjugación con biomoléculas.

Por lo tanto, en una realización preferida de los enlazadores-conjugados de acuerdo con la fórmula (4a) y (4b), los restos espaciadores Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup> y/o Sp<sup>4</sup>, si están presentes, comprenden una secuencia de aminoácidos. Los restos espaciadores que comprenden una secuencia de aminoácidos son conocidos en la técnica, y también pueden denominarse enlazadores peptídicos. Los ejemplos incluyen restos espaciadores que comprenden un resto Val-Cit, p. ej., Val-Cit-PABC, Val-Cit-PAB, Fmoc-Val-Cit-PAB, etc. Preferiblemente, se emplea un resto Val-Cit-PABC en el enlazador-conjugado.

En una realización preferida de los enlazadores-conjugados de acuerdo con la fórmula (4a) y (4b), los restos espaciadores Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup> y Sp<sup>4</sup>, si están presentes, se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en grupos alquilenos C<sub>1</sub> - C<sub>200</sub> lineales o ramificados, grupos alquenileno C<sub>2</sub> - C<sub>200</sub>, grupos alquinileno C<sub>2</sub> - C<sub>200</sub>, grupos cicloalquilenos C<sub>3</sub> - C<sub>200</sub>, grupos cicloalquenileno C<sub>5</sub> - C<sub>200</sub>, grupos cicloalquinileno C<sub>8</sub> - C<sub>200</sub>, grupos alquilarileno C<sub>7</sub> - C<sub>200</sub>, grupos arilalquilenos C<sub>7</sub> - C<sub>200</sub>, grupos arilalquenileno C<sub>8</sub> - C<sub>200</sub> y grupos arilalquinileno C<sub>9</sub> - C<sub>200</sub>, en donde los grupos alquilenos, los grupos alquenileno, los grupos alquinileno, los grupos cicloalquilenos, los grupos cicloalquenileno, los grupos cicloalquinileno, los grupos alquilarileno, los grupos arilalquilenos, los grupos arilalquenileno y los grupos arilalquinileno están opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo de O, S y NR<sup>3</sup>, en donde R<sup>3</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquenilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquinilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub> y grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, en donde los grupos alquilo, los grupos alquenilo, los grupos alquinilo y los grupos cicloalquilo están opcionalmente sustituidos. Cuando los grupos alquilenos, los grupos alquenileno, los grupos alquinileno, los grupos cicloalquilenos, los grupos cicloalquenileno, los grupos cicloalquinileno, los grupos alquilarileno, los grupos arilalquilenos, los grupos arilalquenileno y los grupos arilalquinileno están interrumpidos por uno o varios heteroátomos como se ha definido anteriormente, se prefiere que dichos grupos estén interrumpidos por uno o varios átomos de O, y/o por uno o varios grupos S-S.

Más preferiblemente, los restos espaciadores  $Sp^1$ ,  $Sp^2$ ,  $Sp^3$  y  $Sp^4$ , si están presentes, se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en grupos alquileo  $C_1 - C_{100}$  lineales o ramificados, grupos alquenileno  $C_2 - C_{100}$ , grupos alquinileno  $C_2 - C_{100}$ , grupos cicloalquileo  $C_3 - C_{100}$ , grupos cicloalquenileno  $C_5 - C_{100}$ , grupos cicloalquinileno  $C_8 - C_{100}$ , grupos alquilarileno  $C_7 - C_{100}$ , grupos arilalquileo  $C_7 - C_{100}$ , grupos arilalquenileno  $C_8 - C_{100}$  y grupos arilalquinileno  $C_9 - C_{100}$ , en donde los grupos alquileo, los grupos alquenileno, los grupos alquinileno, los grupos cicloalquileo, los grupos cicloalquenileno, los grupos cicloalquinileno, los grupos alquilarileno, los grupos arilalquileo, los grupos arilalquenileno y los grupos arilalquinileno están opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo de O, S y  $NR^3$ , en donde  $R^3$  se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo  $C_1 - C_{24}$ , grupos alquenilo  $C_2 - C_{24}$ , grupos alquinilo  $C_2 - C_{24}$  y grupos cicloalquilo  $C_3 - C_{24}$ , en donde los grupos alquilo, los grupos alquenilo, los grupos alquinilo y los grupos cicloalquilo están opcionalmente sustituidos.

Aún más preferentemente, los restos espaciadores  $Sp^1$ ,  $Sp^2$ ,  $Sp^3$  y  $Sp^4$ , si están presentes, se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en grupos alquileo  $C_1 - C_{50}$  lineales o ramificados, grupos alquenileno  $C_2 - C_{50}$ , grupos alquinileno  $C_2 - C_{50}$ , grupos cicloalquileo  $C_3 - C_{50}$ , grupos cicloalquenileno  $C_5 - C_{50}$ , grupos cicloalquinileno  $C_8 - C_{50}$ , grupos alquilarileno  $C_7 - C_{50}$ , grupos arilalquileo  $C_7 - C_{50}$ , grupos arilalquenileno  $C_8 - C_{50}$  y grupos arilalquinileno  $C_9 - C_{50}$ , en donde los grupos alquileo, los grupos alquenileno, los grupos alquinileno, los grupos cicloalquileo, los grupos cicloalquenileno, los grupos cicloalquinileno, los grupos alquilarileno, los grupos arilalquileo, los grupos arilalquenileno y los grupos arilalquinileno están opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo de O, S y  $NR^3$ , en donde  $R^3$  se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo  $C_1 - C_{24}$ , grupos alquenilo  $C_2 - C_{24}$ , grupos alquinilo  $C_2 - C_{24}$  y grupos cicloalquilo  $C_3 - C_{24}$ , en donde los grupos alquilo, los grupos alquenilo, los grupos alquinilo y los grupos cicloalquilo están opcionalmente sustituidos.

Aún más preferiblemente, los restos espaciadores  $Sp^1$ ,  $Sp^2$ ,  $Sp^3$  y  $Sp^4$ , si están presentes, se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en grupos alquileo  $C_1 - C_{20}$  lineales o ramificados, grupos alquenileno  $C_2 - C_{20}$ , grupos alquinileno  $C_2 - C_{20}$ , grupos cicloalquileo  $C_3 - C_{20}$ , grupos cicloalquenileno  $C_5 - C_{20}$ , grupos cicloalquinileno  $C_8 - C_{20}$ , grupos alquilarileno  $C_7 - C_{20}$ , grupos arilalquileo  $C_7 - C_{20}$ , grupos arilalquenileno  $C_8 - C_{20}$  y grupos arilalquinileno  $C_9 - C_{20}$ , en donde los grupos alquileo, los grupos alquenileno, los grupos alquinileno, los grupos cicloalquileo, los grupos cicloalquenileno, los grupos cicloalquinileno, los grupos alquilarileno, los grupos arilalquileo, los grupos arilalquenileno y los grupos arilalquinileno están opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo de O, S y  $NR^3$ , en donde  $R^3$  se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo  $C_1 - C_{24}$ , grupos alquenilo  $C_2 - C_{24}$ , grupos alquinilo  $C_2 - C_{24}$  y grupos cicloalquilo  $C_3 - C_{24}$ , en donde los grupos alquilo, los grupos alquenilo, los grupos alquinilo y los grupos cicloalquilo están opcionalmente sustituidos.

En esas realizaciones preferidas, se prefiere adicionalmente que los grupos alquileo, los grupos alquenileno, los grupos alquinileno, los grupos cicloalquileo, los grupos cicloalquenileno, los grupos cicloalquinileno, los grupos alquilarileno, los grupos arilalquileo, los grupos arilalquenileno y los grupos arilalquinileno estén opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo de O, S y  $NR^3$ , preferiblemente O, en donde  $R^3$  se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno y grupos alquilo  $C_1 - C_4$ , preferiblemente hidrógeno o metilo.

Lo más preferiblemente, los restos espaciadores  $Sp^1$ ,  $Sp^2$ ,  $Sp^3$  y  $Sp^4$ , si están presentes, se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en grupos alquileo  $C_1 - C_{20}$  lineales o ramificados, en donde los grupos alquileo están opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo de O, S y  $NR^3$ , en donde  $R^3$  se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo  $C_1 - C_{24}$ , grupos alquenilo  $C_2 - C_{24}$ , grupos alquinilo  $C_2 - C_{24}$  y grupos cicloalquilo  $C_3 - C_{24}$ , en donde los grupos alquilo, los grupos alquenilo, los grupos alquinilo y los grupos cicloalquilo están opcionalmente sustituidos. En esa realización, se prefiere además que los grupos alquileo no estén sustituidos y estén opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo de O, S y  $NR^3$ , preferiblemente O y/o S-S, en donde  $R^3$  se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno y grupos alquilo  $C_1 - C_4$  preferiblemente hidrógeno o metilo.

Los restos espaciadores preferidos  $Sp^1$ ,  $Sp^2$ ,  $Sp^3$  y  $Sp^4$  incluyen por tanto,  $-(CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2CH_2O)_n-$ ,  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$ ,  $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2CH_2CH_2O)_n-$ ,  $-(OCH_2CH_2CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2CH_2-$  y  $-CH_2CH_2CH_2(OCH_2CH_2CH_2)_n-$ , en donde n es un número entero en el intervalo de 1 a 50, preferiblemente en el intervalo de 1 a 40, más preferiblemente en el intervalo de 1 a 30, aún más preferiblemente en el intervalo de 1 a 20 e incluso más preferiblemente en el intervalo de 1 a 15. Más preferiblemente n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, incluso más preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5 o 6, y todavía más preferiblemente 1, 2, 3 o 4.

Puesto que  $Sp^1$ ,  $Sp^2$ ,  $Sp^3$  y  $Sp^4$  se seleccionan independientemente,  $Sp^1$ , si está presente, puede ser diferente de  $Sp^2$ , si está presente, de  $Sp^3$  y/o de  $Sp^4$ , si está presente.

Los grupos reactivos  $Q^1$  se han descrito con más detalle anteriormente. En el enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4a) y (4b), se prefiere que el grupo reactivo  $Q^1$  se seleccione a partir del grupo que consiste en grupos N-

maleimidilo opcionalmente sustituidos, grupos N-alquilamido halogenados, grupos sulfoniloxi N-alquilamido, grupos éster, grupos carbonato, grupos sulfonil haluro, grupos tiol o derivados de los mismos, grupos alqueno, grupos alquino, grupos (hetero)cicloalquino, grupos biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo, grupos cicloalqueno, grupos tetrazinilo, grupos azido, grupos fosfina, grupos óxido de nitrilo, grupos nitrona, grupos nitrilo imina, grupos diazo, grupos cetona, grupos (O-alquil)hidroxilamino, grupos hidrazina, grupos N-maleimidilo halogenados, grupos carbonil haluro, grupos alenamida y grupos 1,1-bis(sulfonilmetil)metilcarbonilo o derivados por eliminación de los mismos. En una realización preferida adicional, Q<sup>1</sup> está de acuerdo con la fórmula (9a), (9b), (9c), (9d), (9e), (9f), (9g), (9h), (9i), (9j), (9k), (9l), (9m), (9n), (9o), (9p), (9q), (9r), (9s), (9t), (9u), (9v), (9w), (9x), (9y), (9z), (9za), (9zb), (9zc), (9zd), (9ze), (9zf), (9zg), (9zh), (9zi), (9zj), (9zk), (9zl), (9zm) o (9zn), en donde (9a), (9b), (9c), (9d), (9e), (9f), (9g), (9h), (9i), (9j), (9k), (9l), (9m), (9n), (9o), (9p), (9q), (9r), (9s), (9t), (9u), (9v), (9w), (9x), (9y), (9z), (9za), (9zb), (9zc), (9zd), (9ze), (9zf), (9zg), (9zh), (9zi), (9zj), (9zk), (9zl), (9zm), (9zn) y sus realizaciones preferidas, son como se han definido anteriormente. En una realización preferida, Q<sup>1</sup> está de acuerdo con la fórmula (9a), (9b), (9c), (9f), (9j), (9n), (9o), (9p), (9q), (9s), (9t), (9zh), (9r), (9zl), (9zm) o (9zn). En una realización aún más preferida, Q<sup>1</sup> está de acuerdo con la fórmula (9a), (9n), (9o), (9q), (9p), (9t), (9zh) o (9s), y en una realización particularmente preferida, Q<sup>1</sup> está de acuerdo con la fórmula (9a), (9q), (9n), (9o), (9p), (9t) o (9zh), y realizaciones preferidas de las mismas, como se ha definido anteriormente.

La molécula diana D y realizaciones preferidas para la molécula diana D en el enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4a) y (4b) son como se han definido anteriormente. D se selecciona a partir del grupo que consiste en un fármaco, un profármaco, un agente de diagnóstico, una proteína, un péptido, un polipéptido, un marcador peptídico, un aminoácido, un glicano, un lípido, una vitamina, un esteroide, un nucleótido un nucleósido, un polinucleótido, un ARN, un ADN, una molécula informadora, un polímero, una superficie sólida, un hidrogel, una nanopartícula, una micropartícula y una biomolécula. Las sustancias activas, moléculas informadoras, polímeros, hidrogeles, superficies sólidas, nanopartículas y micropartículas y biomoléculas, y sus realizaciones preferidas, se han descrito con más detalle anteriormente.

Tal y como se ha descrito anteriormente, R<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, los grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir de O, S y NR<sup>3</sup> en donde R<sup>3</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>, o R<sup>1</sup> es D, -[(Sp<sup>1</sup>)<sub>b</sub>-(Z<sup>2</sup>)<sub>e</sub>-(Sp<sup>4</sup>)<sub>i</sub>-D] o -[(Sp<sup>2</sup>)<sub>c</sub>-(Z<sup>1</sup>)<sub>d</sub>-(Sp<sup>3</sup>)<sub>g</sub>-Q<sup>1</sup>], en donde Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup>, Sp<sup>4</sup>, Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup>, D, Q<sup>1</sup>, b, c, d, e, g e i son como se han definido anteriormente.

En una realización preferida, R<sup>1</sup> es hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>20</sub>, más preferiblemente R<sup>1</sup> es hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>16</sub>, incluso más preferiblemente R<sup>1</sup> es hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>10</sub>, en donde el grupo alquilo está opcionalmente sustituido y opcionalmente interrumpido por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir de O, S y NR<sup>3</sup>, preferiblemente O, en donde R<sup>3</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>. En una realización preferida adicional, R<sup>1</sup> es hidrógeno. En otra realización preferida, R<sup>1</sup> es un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>20</sub>, más preferiblemente un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>16</sub>, incluso más preferiblemente un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>10</sub>, en donde el grupo alquilo está opcionalmente interrumpido por uno o varios átomos de O, y en donde el grupo alquilo está opcionalmente sustituido con un grupo -OH, preferiblemente un grupo -OH terminal. En esa realización, se prefiere además que R<sup>1</sup> sea una cadena de polietilenglicol que comprende un grupo terminal -OH. En otra realización adicional preferida, R<sup>1</sup> es un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub>, más preferiblemente un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>, incluso más preferiblemente un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>, y aún más preferiblemente, R<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo y t-butilo.

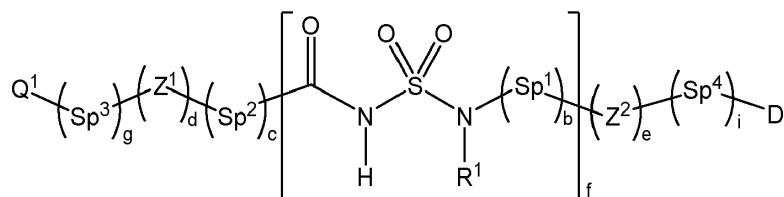
En otra realización preferida, R<sup>1</sup> es una molécula diana D, -[(Sp<sup>1</sup>)<sub>b</sub>-(Z<sup>2</sup>)<sub>e</sub>-(Sp<sup>4</sup>)<sub>i</sub>-D] o -[(Sp<sup>2</sup>)<sub>c</sub>-(Z<sup>1</sup>)<sub>d</sub>-(Sp<sup>3</sup>)<sub>g</sub>-Q<sup>1</sup>], en donde Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup>, Sp<sup>4</sup>, Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup>, D, Q<sup>1</sup>, b, c, d, e, g e i son como se han definido anteriormente. Cuando R<sup>1</sup> es D o -[(Sp<sup>1</sup>)<sub>b</sub>-(Z<sup>2</sup>)<sub>e</sub>-(Sp<sup>4</sup>)<sub>i</sub>-D], se prefiere además que el enlazador-conjugado esté de acuerdo con la fórmula (4a). En esa realización, el enlazador-conjugado (4a) comprende dos moléculas diana D, que pueden ser iguales o diferentes. Cuando R<sup>1</sup> es -[(Sp<sup>1</sup>)<sub>b</sub>-(Z<sup>2</sup>)<sub>e</sub>-(Sp<sup>4</sup>)<sub>i</sub>-D], Sp<sup>1</sup>, b, Z<sup>2</sup>, e, Sp<sup>4</sup>, i y D en -[(Sp<sup>1</sup>)<sub>b</sub>-(Z<sup>2</sup>)<sub>e</sub>-(Sp<sup>4</sup>)<sub>i</sub>-D] pueden ser iguales o diferentes a Sp<sup>1</sup>, b, Z<sup>2</sup>, e, Sp<sup>4</sup>, i y D en el otro -[(Sp<sup>1</sup>)<sub>b</sub>-(Z<sup>2</sup>)<sub>e</sub>-(Sp<sup>4</sup>)<sub>i</sub>-D] que está fijado al átomo de N de N(R<sup>1</sup>). En una realización preferida, ambos grupos -[(Sp<sup>1</sup>)<sub>b</sub>-(Z<sup>2</sup>)<sub>e</sub>-(Sp<sup>4</sup>)<sub>i</sub>-D] en el átomo de N de N(R<sup>1</sup>) son iguales.

Cuando R<sup>1</sup> es -[(Sp<sup>2</sup>)<sub>c</sub>-(Z<sup>1</sup>)<sub>d</sub>-(Sp<sup>3</sup>)<sub>g</sub>-Q<sup>1</sup>], se prefiere además que el enlazador-conjugado esté de acuerdo con la fórmula (4b). En esa realización, el enlazador-conjugado (4b) comprende dos moléculas diana Q<sup>1</sup>, que pueden ser iguales o diferentes. Cuando R<sup>1</sup> es -[(Sp<sup>2</sup>)<sub>c</sub>-(Z<sup>1</sup>)<sub>d</sub>-(Sp<sup>3</sup>)<sub>g</sub>-Q<sup>1</sup>], Sp<sup>2</sup>, c, Z<sup>1</sup>, d, Sp<sup>3</sup>, g y D en -[(Sp<sup>1</sup>)<sub>b</sub>-(Z<sup>2</sup>)<sub>e</sub>-(Sp<sup>4</sup>)<sub>i</sub>-D] pueden ser iguales o diferentes a Sp<sup>1</sup>, b, Z<sup>2</sup>, e, Sp<sup>4</sup>, i y Q<sup>1</sup> en el otro -[(Sp<sup>2</sup>)<sub>c</sub>-(Z<sup>1</sup>)<sub>d</sub>-(Sp<sup>3</sup>)<sub>g</sub>-Q<sup>1</sup>] que está fijado al átomo de N de N(R<sup>1</sup>). En una realización preferida, ambos grupos -[(Sp<sup>2</sup>)<sub>c</sub>-(Z<sup>1</sup>)<sub>d</sub>-(Sp<sup>3</sup>)<sub>g</sub>-Q<sup>1</sup>] en el átomo de N de N(R<sup>1</sup>) son iguales.

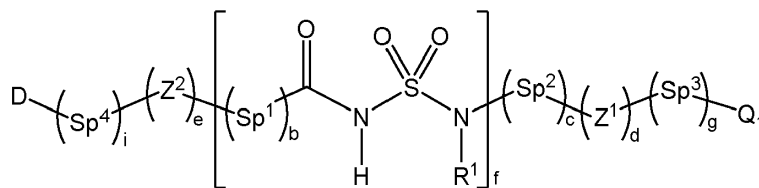
En los enlazadores conjugados de acuerdo con la fórmula (4a) y (4b), f es un número entero en el intervalo de 1 a 150. El enlazador-conjugado puede comprender por tanto más de un grupo de acuerdo con la fórmula (1), en donde el grupo de acuerdo con la fórmula (1) es como se ha definido anteriormente. Cuando más de un grupo de acuerdo con la fórmula (1) está presente, es decir, cuando f es 2 o más, entonces a, b, Sp<sup>1</sup> y R<sup>1</sup> se seleccionan

independientemente. En otras palabras, cuando f es 2 o más, cada a es independientemente 0 o 1, cada b es independientemente 0 o 1, cada Sp<sup>1</sup> puede ser igual o diferente y cada R<sup>1</sup> puede ser igual o diferente. En una realización preferida, f es un número entero en el intervalo de 1 a 100, preferiblemente en el intervalo de 1 a 50, más preferiblemente en el intervalo de 1 a 25, e incluso más preferiblemente en el intervalo de 1 a 15. Más preferiblemente, f es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, incluso más preferiblemente f es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, pero aún más preferiblemente f es 1, 2, 3 o 4, y lo más preferiblemente f es 1 en esa realización. En otra realización preferida, f es un número entero en el intervalo de 2 a 150, preferiblemente en el intervalo de 2 a 100, más preferiblemente en el intervalo de 2 a 50, más preferiblemente en el intervalo de 2 a 25, e incluso más preferiblemente en el intervalo de 2 a 15. Más preferiblemente, f es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, aún más preferiblemente f es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, aún más preferiblemente, f es 2, 3, 4, 5 o 6, pero aún más preferiblemente f es 2, 3 o 4, y lo más preferiblemente f es 2 en esa realización.

Como se ha descrito anteriormente, en una realización preferida, a es 0 en el compuesto de acuerdo con la fórmula (4a) o (4b). Por lo tanto, la invención también se refiere a un compuesto de acuerdo con la fórmula (6a) o (6b), o una de sus sales:



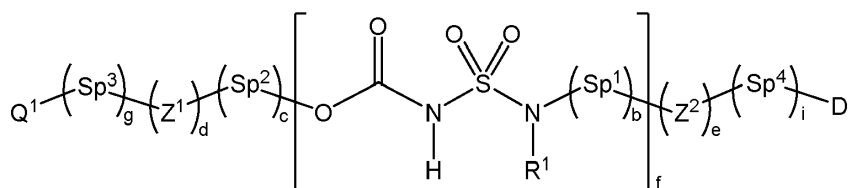
6a



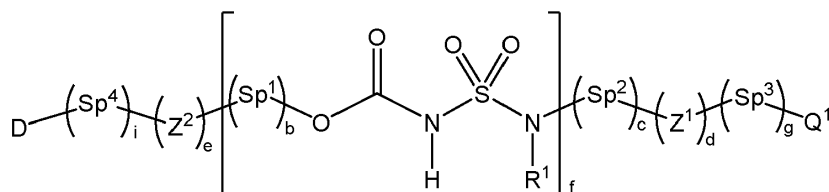
6b

en donde a, b, c, d, e, f, g, i, D, Q<sup>1</sup>, Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup>, Sp<sup>4</sup>, Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup> y R<sup>1</sup>, y sus realizaciones preferidas, son como se han definido anteriormente para (4a) y (4b).

Como se ha descrito anteriormente, en otra realización preferida, a es 1 en el compuesto de acuerdo con la fórmula (4a) o (4b). Por lo tanto, la invención también se refiere a un compuesto de acuerdo con la fórmula (7a) o (7b), o una de sus sales:



7a

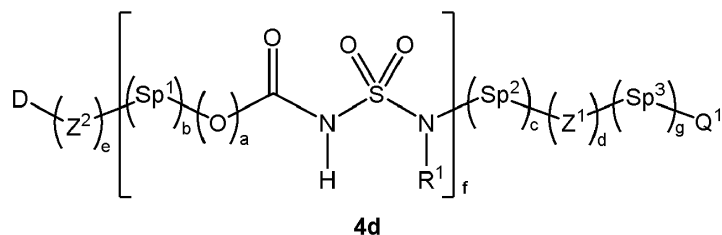
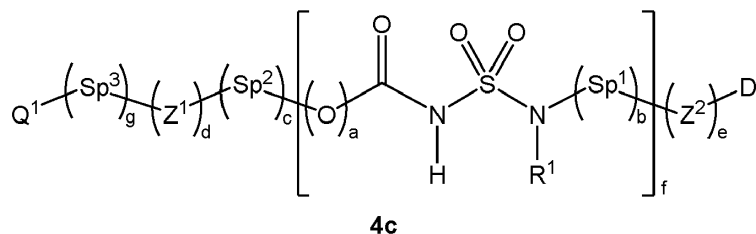


7b

en donde a, b, c, d, e, f, g, i, D, Q<sup>1</sup>, Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup>, Sp<sup>4</sup>, Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup> y R<sup>1</sup>, y sus realizaciones preferidas, son como se han definido anteriormente para (4a) y (4b).

Cuando Sp<sup>4</sup> está ausente en el enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4a), es decir, cuando i es 0, la molécula diana D está unida a Z<sup>2</sup> (cuando e es 1), a Sp<sup>1</sup> (cuando e es 0 y b es 1) o a N(R<sup>1</sup>) (cuando e es 0 y b es 0). Cuando Sp<sup>4</sup> está ausente en el enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4b), es decir, cuando i es 0, la molécula diana D está unida a Z<sup>2</sup> (cuando e es 1), a Sp<sup>1</sup> (cuando e es 0 y b es 1), al átomo de O (cuando a es 1 y b

y e son 0) o al grupo C(O) (cuando a es 0 y b y e son 0). Por lo tanto, la invención también se refiere a un enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4c) o (4d), o una de sus sales:



5 en donde:

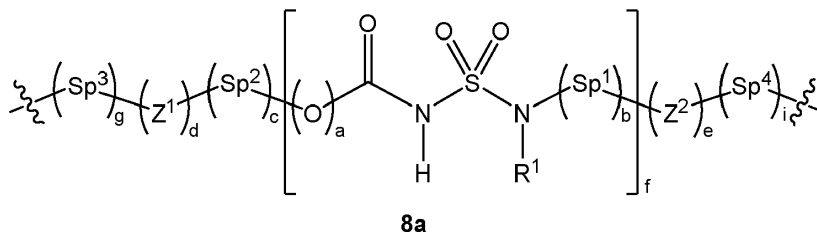
a, b, c, d, e, f, g, D, Q<sup>1</sup>, Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup>, Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup> y R<sup>1</sup>, y sus realizaciones preferidas, son como se han definido anteriormente para (4a) y (4b).

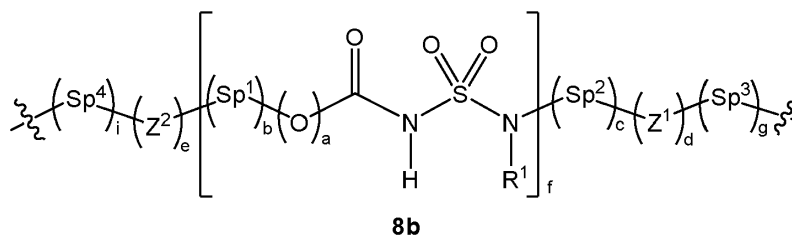
En una realización preferida, en el enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4c) o (4d), a es 0. En otra realización preferida, en el enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4c) o (4d), a es 1.

10 En una realización específica del enlazador-conjugado de acuerdo con la invención, particularmente un enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4a), (4b), (4c), (4d), (6a), (6b), (7a) o (7b), Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup> y Sp<sup>4</sup>, si están presentes, se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en grupos alquileo C<sub>1</sub> - C<sub>20</sub> lineales o ramificados, en donde los grupos alquileo están opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo que consiste en O, S y NR<sup>3</sup>, en donde R<sup>3</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno y grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>, y Q<sup>1</sup> está de acuerdo con la fórmula (9a), (9b), (9c), (9d), (9e), (9f), (9g), (9h), (9i), (9j), (9k), (9l), (9m), (9n), (9o), (9p), (9q), (9r), (9s), (9t), (9u), (9v), (9w), (9x), (9y), (9z), (9za), (9zb), (9zc), (9zd), (9ze), (9zf), (9zg), (9zh), (9zi), (9zj), (9zk), (9zl), (9zm) o (9zn), en donde (9a), (9b), (9c), (9d), (9e), (9f), (9g), (9h), (9i), (9j), (9k), (9l), (9m), (9n), (9o), (9p), (9q), (9r), (9s), (9t), (9u), (9v), (9w), (9x), (9y), (9z), (9za), (9zb), (9zc), (9zd), (9ze), (9zf), (9zg), (9zh), (9zi), (9zj), (9zk), (9zl), (9zm), (9zn) y sus realizaciones preferidas, son como se han definido anteriormente. En una realización preferida, Q<sup>1</sup> está de acuerdo con la fórmula (9a), (9b), (9c), (9f), (9j), (9n), (9o), (9p), (9q), (9s), (9t), (9zh), (9r), (9zl), (9zm) o (9zn). En una realización aún más preferida, Q<sup>1</sup> está de acuerdo con la fórmula (9a), (9n), (9o), (9p), (9q), (9t), (9zh) o (9s), y en una realización particularmente preferida, Q<sup>1</sup> está de acuerdo con la fórmula (9a), (9q), (9n), (9p), (9t), (9zh) o (9o), y realizaciones preferidas de las mismas, como se han definido anteriormente.

25 Un enlazador se define en esta memoria como un resto que conecta dos o más elementos de un compuesto.

En consecuencia, en el enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4a), (4b), (4c), (4d), (6a), (6b), (7a) o (7b) tal y como se han definido anteriormente, el enlazador tal y como se ha definido anteriormente se puede representarse por la fórmula (8a) y (8b), respectivamente:





5 Como entenderá el experto en la materia, las realizaciones preferidas de los restos espaciadores (**8a**) y (**8b**) pueden depender, por ejemplo, de la naturaleza de los grupos reactivos Q<sup>1</sup> y D en el enlazador-conjugado, del método sintético para preparar el enlazador-conjugado (por ejemplo, la naturaleza del grupo funcional complementario F<sup>2</sup> en una molécula diana), de la naturaleza de un bioconjugado que se prepara utilizando el enlazador-conjugado (por ejemplo, la naturaleza del grupo funcional complementario F<sup>1</sup> en la glicoproteína).

Cuando Q<sup>1</sup> es, por ejemplo, un grupo ciclooctinilo de acuerdo con la fórmula (**9n**), (**9o**), (**9p**), (**9q**) o (**9zk**) como se han definido anteriormente, entonces preferiblemente Sp<sup>3</sup> está presente (g es 1).

10 Cuando, por ejemplo, el enlazador-conjugado se ha preparado mediante la reacción de un grupo reactivo Q<sup>2</sup> que es un grupo ciclooctinilo de acuerdo con la fórmula (**9n**), (**9o**), (**9p**), (**9q**) o (**9zk**), con un grupo funcional azido F<sup>2</sup>, entonces preferiblemente Sp<sup>4</sup> está presente (i es 1).

Además, se prefiere que al menos uno de Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup> y Sp<sup>4</sup> esté presente, es decir, al menos uno de b, c, g, e i no sea 0. En otra realización preferida, al menos uno de Sp<sup>1</sup> y Sp<sup>4</sup> y al menos uno de Sp<sup>2</sup> y Sp<sup>3</sup> están presentes.

Cuando f es 2 o más, se prefiere que Sp<sup>1</sup> esté presente (b es 1).

15 Estas realizaciones preferidas del resto enlazador (**8a**) y (**8b**) también se conservan para el resto enlazador en los bioconjugados de acuerdo con la invención como se describe con más detalle a continuación.

Las realizaciones preferidas de Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup> y Sp<sup>4</sup> son como se han definido anteriormente.

#### Enlazador-estructura artificial

20 Un enlazador-estructura artificial se define en esta memoria como un compuesto en el que un grupo reactivo Q<sup>1</sup> está conectado covalentemente con un grupo reactivo Q<sup>2</sup> a través de un enlazador. Un enlazador-estructura artificial comprende un grupo reactivo Q<sup>1</sup> capaz de reaccionar con un grupo reactivo F<sup>1</sup> presente en una glicoproteína, y un grupo reactivo Q<sup>2</sup> capaz de reaccionar con un grupo reactivo F<sup>2</sup> presente en una molécula diana. Q<sup>1</sup> y Q<sup>2</sup> pueden ser iguales o diferentes. Un enlazador-estructura artificial puede comprender más de un grupo reactivo Q<sup>1</sup> y/o más de un grupo reactivo Q<sup>2</sup>. Cuando está presente más de un grupo reactivo Q<sup>1</sup>, los grupos Q<sup>1</sup> pueden ser iguales o diferentes, y cuando está presente más de un grupo reactivo Q<sup>2</sup>, los grupos Q<sup>2</sup> pueden ser iguales o diferentes.

25 En esta memoria también se describe un compuesto, más particularmente un enlazador-estructura artificial, en donde dicho compuesto comprende un extremo alfa y un extremo omega, comprendiendo el compuesto en el extremo alfa un grupo funcional Q<sup>1</sup> capaz de reaccionar con un grupo funcional F<sup>1</sup> presente en una biomolécula y en el extremo omega un grupo funcional Q<sup>2</sup> capaz de reaccionar con un grupo funcional F<sup>2</sup> presente en una molécula diana, en donde el compuesto comprende adicionalmente un grupo de acuerdo con la fórmula (**1**), o una de sus sales, en donde dicho grupo de acuerdo con la fórmula (**1**) es como se ha definido anteriormente, y en donde el grupo de acuerdo con la fórmula (**1**), o una de sus sales, está situado entre dicho extremo alfa y dicho extremo omega del compuesto.

35 El grupo reactivo Q<sup>1</sup> está unido covalentemente con el extremo alfa del compuesto y el grupo reactivo Q<sup>2</sup> está unido covalentemente con un extremo omega del compuesto.

Este compuesto también se puede denominar un enlazador-estructura artificial. En el enlazador-estructura artificial, un grupo reactivo Q<sup>2</sup> está conectado covalentemente con un grupo reactivo Q<sup>1</sup> a través de un enlazador, y dicho enlazador comprende un grupo de acuerdo con la fórmula (**1**), o una sal del mismo, como se ha definido anteriormente. Cuando el enlazador-estructura artificial comprende una sal del grupo de acuerdo con la fórmula (**1**), la sal es preferiblemente una sal farmacéuticamente aceptable.

El enlazador-estructura artificial puede comprender más de un grupo reactivo Q<sup>2</sup>. En consecuencia, el enlazador puede comprender, por ejemplo, un tercer extremo (cuarto, quinto, etc.), que puede denominarse un extremo psi, chi, phi, etc., en donde el tercer extremo (cuarto, quinto, etc.) comprende un grupo reactivo Q<sup>2</sup>. De manera similar, el enlazador-conjugado puede comprender más de un grupo reactivo Q<sup>1</sup>.

45 Por lo tanto, el enlazador-estructura artificial también se puede denominar (Q<sup>1</sup>)<sub>y</sub>-Sp-(Q<sup>2</sup>)<sub>z</sub>, en donde y es un número entero en el intervalo de 1 a 10 y z es un número entero en el intervalo de 1 a 10.

También se describe en esta memoria un enlazador-estructura artificial de acuerdo con la fórmula:



en donde:

y es un número entero en el intervalo de 1 a 10;

5 z es un número entero en el intervalo de 1 a 10;

Q<sup>1</sup> es un grupo reactivo capaz de reaccionar con un grupo funcional F<sup>1</sup> presente en una biomolécula;

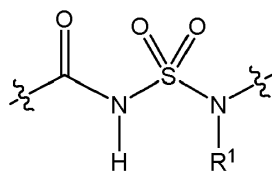
Q<sup>2</sup> es un grupo reactivo capaz de reaccionar con un grupo funcional F<sup>2</sup> presente en una molécula diana;

Sp es un resto espaciador, en donde un resto espaciador se define como un resto que separa (es decir, proporciona una cierta distancia entre) y une covalentemente un grupo reactivo Q<sup>1</sup> y un grupo reactivo Q<sup>2</sup>; y

10 en donde dicho resto espaciador comprende un grupo de acuerdo con la Fórmula (1) o una de sus sales, en donde el grupo de acuerdo con la Fórmula (1) es como se ha definido anteriormente.

Preferiblemente, y es 1, 2, 3 o 4, más preferiblemente y es 1 o 2 y lo más preferiblemente, y es 1. Preferiblemente, z es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, más preferiblemente z es 1, 2, 3 o 4, incluso más preferiblemente z es 1, 2 o 3, aún más preferiblemente z es 1 o 2 y lo más preferiblemente z es 1. Más preferiblemente, y es 1 o 2, preferiblemente 1, y z es 1, 2, 3 o 4, pero aún más preferiblemente y es 1 o 2, preferiblemente 1, y z es 1, 2 o 3, y aún más preferiblemente y es 1 o 2, preferiblemente 1, y z es 1 o 2, y lo más preferiblemente y es 1 y z es 1. En una realización preferida, el enlazador-estructura artificial está de acuerdo con la fórmula Q<sup>1</sup>-Sp-(Q<sup>2</sup>)<sub>4</sub>, Q<sup>1</sup>-Sp-(Q<sup>2</sup>)<sub>3</sub>, Q<sup>1</sup>-Sp-(Q<sup>2</sup>)<sub>2</sub> o Q<sup>1</sup>-Sp-Q<sup>2</sup>.

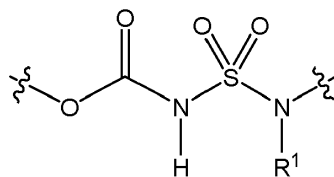
El enlazador-estructura artificial comprende un grupo de acuerdo con la fórmula (1) tal y como se ha definido anteriormente, o una sal del mismo. En una realización preferida, el enlazador-estructura artificial comprende un grupo de acuerdo con la fórmula (1) en donde a es 0, o una sal del mismo. En esa realización, el enlazador-estructura artificial comprende de este modo un grupo de acuerdo con la fórmula (2) o una sal del mismo:



2

en donde R<sup>1</sup> es como se ha definido anteriormente.

25 En otra realización preferida, el enlazador-estructura artificial comprende un grupo de acuerdo con la fórmula (1) en donde a es 1, o una sal del mismo. En esta realización, el enlazador-estructura artificial comprende de este modo un grupo de acuerdo con la fórmula (3) o una sal del mismo:



3

en donde R<sup>1</sup> es como se ha definido anteriormente.

30 En el enlazador-estructura artificial, R<sup>1</sup> y las realizaciones preferidas de R<sup>1</sup> son como se han definido anteriormente. Además, el grupo reactivo Q<sup>1</sup> y el resto espaciador Sp, así como sus realizaciones preferidas, son como se han definido anteriormente para el enlazador-conjugado de acuerdo con la invención.

Más en particular, el enlazador-estructura artificial es un compuesto de acuerdo con la fórmula:



en donde:

35 y es un número entero en el intervalo de 1 a 10;



z es un número entero en el intervalo de 1 a 10;

Q<sup>1</sup> es un grupo reactivo capaz de reaccionar con un grupo funcional F<sup>1</sup> presente en una biomolécula;

Q<sup>2</sup> es un grupo reactivo capaz de reaccionar con un grupo funcional F<sup>2</sup> presente en una biomolécula;

5 Sp es un resto espaciador, en donde un resto espaciador se define como un resto que separa (es decir, proporciona una cierta distancia entre) y une covalentemente los grupos reactivos Q<sup>1</sup> y Q<sup>2</sup>;

Z<sup>w</sup> es un grupo de conexión que conecta el grupo reactivo Q<sup>1</sup> con dicho resto espaciador;

Z<sup>x</sup> es un grupo de conexión que conecta el grupo reactivo Q<sup>2</sup> con dicho resto espaciador; y

en donde dicho resto espaciador comprende un grupo de acuerdo con la Fórmula (1) o una de sus sales, en donde el grupo de acuerdo con la Fórmula (1) es como se ha definido anteriormente.

10 En una realización preferida, a en el grupo de acuerdo con la fórmula (1) es 0. En otra realización preferida, a en el grupo de acuerdo con la fórmula (1) es 1.

Realizaciones preferidas para y y z son las definidas anteriormente para (Q<sup>1</sup>)<sub>y</sub>-Sp-(Q<sup>2</sup>)<sub>z</sub>. Además, se prefiere que el compuesto esté de acuerdo con la fórmula Q<sup>1</sup>-(Z<sup>w</sup>)-Sp-(Z<sup>x</sup>)-(Q<sup>2</sup>)<sub>4</sub>, Q<sup>1</sup>-(Z<sup>w</sup>)-Sp-(Z<sup>x</sup>)-(Q<sup>2</sup>)<sub>3</sub>, Q<sup>1</sup>-(Z<sup>w</sup>)-Sp-(Z<sup>x</sup>)-(Q<sup>2</sup>)<sub>2</sub> o Q<sup>1</sup>-(Z<sup>w</sup>)-Sp-(Z<sup>x</sup>)-Q<sup>2</sup>, más preferiblemente Q<sup>1</sup>-(Z<sup>w</sup>)-Sp-(Z<sup>x</sup>)-(Q<sup>2</sup>)<sub>2</sub> o Q<sup>1</sup>-(Z<sup>w</sup>)-Sp-(Z<sup>x</sup>)-Q<sup>2</sup>, en donde Z<sup>w</sup> y Z<sup>x</sup> son como se han definido anteriormente.

En el compuesto enlazador, Z<sup>w</sup> y Z<sup>x</sup> se seleccionan preferiblemente de forma independiente a partir del grupo que consiste en -O-, -S-, -NR<sup>2</sup>-, -N=N-, -C(O)-, -C(O)-NR<sup>2</sup>-, -O-C(O)-, -O-C(O)-O-, -O-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-C(O)-, -NR<sup>2</sup>-C(O)-O-, -NR<sup>2</sup>-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -S-C(O)-, -S-C(O)-O-, -S-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -O-S(O)<sub>2</sub>-, -O-S(O)<sub>2</sub>-O-, -O-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>2</sup>-, -O-S(O)-, -O-S(O)-O-, -O-S(O)-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-C(O)-, -O-NR<sup>2</sup>-C(O)-O-, -O-NR<sup>2</sup>-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-O-C(O)-, -NR<sup>2</sup>-O-C(O)-O-, -NR<sup>2</sup>-O-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-C(S)-, -O-NR<sup>2</sup>-C(S)-O-, -O-NR<sup>2</sup>-C(S)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-O-C(S)-, -NR<sup>2</sup>-O-C(S)-O-, -NR<sup>2</sup>-O-C(S)-NR<sup>2</sup>-, -O-C(S)-, -O-C(S)-O-, -O-C(S)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-C(S)-, -NR<sup>2</sup>-C(S)-O-, -NR<sup>2</sup>-C(S)-NR<sup>2</sup>-, -S-S(O)<sub>2</sub>-, -S-S(O)<sub>2</sub>-O-, -S-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)-O-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)<sub>2</sub>-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)<sub>2</sub>-O-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)-O-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)<sub>2</sub>-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)<sub>2</sub>-O-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>2</sup>-, -O-P(O)(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub>-, -S-P(O)(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub>-, -NR<sup>2</sup>-P(O)(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub>- y combinaciones de dos o más de los mismos, en donde R<sup>2</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alqueno C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquino C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub> y grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, en donde los grupos alquilo, grupos alqueno, grupos alquino y grupos cicloalquilo, están opcionalmente sustituidos.

Las realizaciones preferidas para Q<sup>1</sup> son como se han definido anteriormente.

En el enlazador-estructura artificial, Q<sup>2</sup> es un grupo reactivo capaz de reaccionar con un grupo funcional F<sup>2</sup> presente en una molécula diana. Grupos reactivos Q<sup>2</sup> capaces de reaccionar con un grupo funcional F<sup>2</sup> de ese tipo son conocidos por un experto en la materia. En una realización preferida, Q<sup>2</sup> es un grupo reactivo seleccionado a partir del grupo que consiste en grupos N-maleimidilo opcionalmente sustituidos, grupos N-alquilamido halogenados, grupos sulfonilo N-alquilamido, grupos éster, grupos carbonato, grupos sulfonil haluro, grupos tiol o derivados de los mismos, grupos alqueno, grupos alquino, grupos (hetero)cicloalquino, grupos biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo], grupos cicloalqueno, grupos tetrazinilo, grupos azido, grupos fosfina, grupos óxido de nitrilo, grupos nitrona, grupos nitrilo imina, grupos diazo, grupos cetona, grupos (O-alquil)hidroxilamino, grupos hidrazina, grupos N-maleimidilo halogenados, grupos 1,1-bis(sulfonilmetil)metilcarbonilo o derivados por eliminación de los mismos, grupos carbonil haluro y grupos alenamida, -[C(R<sup>17</sup>)<sub>2</sub>C(R<sup>17</sup>)<sub>2</sub>O]<sub>q</sub>-R<sup>17</sup>, en donde q está en el intervalo de 1 a 200, -CN, -NCV, -VCN, -VR<sup>17</sup>, -N(R<sup>17</sup>)<sub>2</sub>, +N(R<sup>17</sup>)<sub>3</sub>, -C(V)N(R<sup>17</sup>)<sub>2</sub>, -C(R<sup>17</sup>)<sub>2</sub>VR<sup>17</sup>, -C(V)R<sup>17</sup>, -C(V)VR<sup>17</sup>, -S(O)R<sup>17</sup>, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>17</sup>, -S(O)OR<sup>17</sup>, -S(O)<sub>2</sub>OR<sup>17</sup>, -S(O)N(R<sup>17</sup>)<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>17</sup>)<sub>2</sub>, -OS(O)R<sup>17</sup>, -OS(O)<sub>2</sub>R<sup>17</sup>, -OS(O)OR<sup>17</sup>, -OS(O)<sub>2</sub>OR<sup>17</sup>, -P(O)(R<sup>17</sup>)(OR<sup>17</sup>), -P(O)(OR<sup>17</sup>)<sub>2</sub>, -OP(O)(OR<sup>17</sup>)<sub>2</sub>, -Si(R<sup>17</sup>)<sub>3</sub>, -VC(V)R<sup>17</sup>, -VC(V)VR<sup>17</sup>, -VC(V)N(R<sup>17</sup>)<sub>2</sub>, -N(R<sup>17</sup>)C(V)R<sup>17</sup>, -N(R<sup>17</sup>)C(V)VR<sup>17</sup> y -N(R<sup>17</sup>)C(V)N(R<sup>17</sup>)<sub>2</sub>, en donde V es O o S y en donde R<sup>17</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>6</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub>.

En una realización preferida adicional, Q<sup>2</sup> está de acuerdo con la fórmula (9a), (9b), (9c), (9d), (9e), (9f), (9g), (9h), (9i), (9j), (9k), (9l), (9m), (9n), (9o), (9p), (9q), (9r), (9s), (9t), (9u), (9v), (9w), (9x), (9y), (9z), (9za), (9zb), (9zc), (9zd), (9ze), (9zf), (9zg), (9zh), (9zi), (9zj), (9zk), (9zl), (9zm) o (9zn), en donde (9a), (9b), (9c), (9d), (9e), (9f), (9g), (9h), (9i), (9j), (9k), (9l), (9m), (9n), (9o), (9p), (9q), (9r), (9s), (9t), (9u), (9v), (9w), (9x), (9y), (9z), (9za), (9zb), (9zc), (9zd), (9ze), (9zf), (9zg), (9zh), (9zi), (9zj), (9zk), (9zl), (9zm), (9zn) y sus realizaciones preferidas, son tal y como se han definido anteriormente. En esa realización se prefiere además que Q<sup>2</sup> esté de acuerdo con la fórmula (9a), (9b), (9c), (9f), (9j), (9n), (9o), (9p), (9q), (9s), (9t), (9zh), (9r), (9zl), (9zm) o (9zn), más preferiblemente de acuerdo con la fórmula (9a), (9n), (9o), (9p), (9q), (9t), (9zh) o (9s), y aún más preferiblemente que Q<sup>2</sup> esté de acuerdo con la fórmula (9a), (9p), (9q), (9n), (9t), (9zh) o (9o), y realizaciones preferidas de las mismas, como se han definido anteriormente. Lo más preferiblemente, Q<sup>2</sup> está de acuerdo con la fórmula (9a), (9p), (9q), (9n), (9t), (9zh) o (9o), y realizaciones preferidas de las mismas, como se han definido anteriormente.

En otra realización preferida adicional,  $Q^2$  se selecciona a partir del grupo que consiste en  $-[C(R^{17})_2C(R^{17})_2O]_q-R^{17}$ , en donde  $q$  está en el intervalo de 1 a 200,  $-CN$ ,  $-NCV$ ,  $-VCN$ ,  $-VR^{17}$ ,  $-N(R^{17})_2$ ,  $-N(R^{17})_3$ ,  $-C(V)N(R^{17})_2$ ,  $-C(R^{17})_2VR^{17}$ ,  $-C(V)R^{17}$ ,  $-C(V)VR^{17}$ ,  $-S(O)R^{17}$ ,  $-S(O)_2R^{17}$ ,  $-S(O)OR^{17}$ ,  $-S(O)_2OR^{17}$ ,  $-S(O)N(R^{17})_2$ ,  $-S(O)_2N(R^{17})_2$ ,  $-OS(O)R^{17}$ ,  $-OS(O)_2R^{17}$ ,  $-OS(O)OR^{17}$ ,  $-OS(O)_2OR^{17}$ ,  $-P(O)(R^{17})(OR^{17})$ ,  $-P(O)(OR^{17})_2$ ,  $-OP(O)(OR^{17})_2$ ,  $-Si(R^{17})_3$ ,  $-VC(V)R^{17}$ ,  $-VC(V)VR^{17}$ ,  $-VC(V)N(R^{17})_2$ ,  $-N(R^{17})C(V)R^{17}$ ,  $-N(R^{17})C(V)VR^{17}$  y  $-N(R^{17})C(V)N(R^{17})_2$ , en donde  $V$  y  $R^{17}$  son como se han definido anteriormente. En esa realización se prefiere además que  $Q^2$  se seleccione a partir del grupo que consiste en  $-OR^{17}$ ,  $-SR^{17}$ ,  $-N(R^{17})_2$ ,  $-N(R^{17})_3$ ,  $-C(O)N(R^{17})_2$ ,  $-C(R^{17})_2OR^{17}$ ,  $-C(O)R^{17}$ ,  $-C(O)OR^{17}$ ,  $-S(O)R^{17}$ ,  $-S(O)_2R^{17}$ ,  $-S(O)OR^{17}$ ,  $-S(O)_2OR^{17}$ ,  $-S(O)N(R^{17})_2$ ,  $-S(O)_2N(R^{17})_2$ ,  $-OS(O)R^{17}$ ,  $-OS(O)_2R^{17}$ ,  $-OS(O)OR^{17}$ ,  $-OS(O)_2OR^{17}$ ,  $-P(O)(R^{17})(OR^{17})$ ,  $-P(O)(OR^{17})_2$ ,  $-OP(O)(OR^{17})_2$ ,  $-Si(R^{17})_3$ ,  $-OC(O)R^{17}$ ,  $-OC(O)OR^{17}$ ,  $-OC(O)N(R^{17})_2$ ,  $-N(R^{17})C(O)R^{17}$ ,  $-N(R^{17})C(O)OR^{17}$  y  $-N(R^{17})C(O)N(R^{17})_2$ , en donde  $R^{17}$  es como se ha definido anteriormente.

En una realización específica del enlazador-estructura artificial,  $Q^1$  está de acuerdo con la fórmula (9a), (9b), (9c), (9d), (9e), (9f), (9g), (9h), (9i), (9j), (9k), (9l), (9m), (9n), (9o), (9p), (9q), (9r), (9s), (9t), (9u), (9v), (9w), (9x), (9y), (9z), (9za), (9zb), (9zc), (9zd), (9ze), (9zf), (9zg), (9zh), (9zi), (9zj), (9zk), (9zl), (9zm) o (9zn), en donde (9a), (9b), (9c), (9d), (9e), (9f), (9g), (9h), (9i), (9j), (9k), (9l), (9m), (9n), (9o), (9p), (9q), (9r), (9s), (9t), (9u), (9v), (9w), (9x), (9y), (9z), (9za), (9zb), (9zc), (9zd), (9ze), (9zf), (9zg), (9zh), (9zi), (9zj), (9zk), (9zl), (9zm), (9zn) y sus realizaciones preferidas, son como se han definido anteriormente; y el resto espaciador  $Sp$  se selecciona a partir del grupo que consiste en grupos alquileo  $C_1 - C_{20}$  lineales o ramificados, en donde los grupos alquileo están opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo que consiste en  $O$ ,  $S$  y  $NR^3$ , en donde  $R^3$  se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno y grupos alquilo  $C_1 - C_4$ ; en donde el resto espaciador  $Sp$  está interrumpido por uno o varios grupos de acuerdo con la fórmula (1) o una sal de la misma; y en donde (1) es como se ha definido anteriormente.

En una realización preferida, dicho resto espaciador  $Sp$  está interrumpido por uno o varios grupos de acuerdo con la fórmula (2), o una sal de la misma, en donde (2) es como se ha definido anteriormente. En otra realización preferida, dicho resto espaciador  $Sp$  está interrumpido por uno o varios grupos de acuerdo con la fórmula (3), o una sal de la misma, en donde (3) es como se ha definido anteriormente.

En una realización preferida adicional,  $Q^1$  está de acuerdo con la fórmula (9a), (9b), (9c), (9f), (9j), (9n), (9o), (9p), (9q), (9s), (9t), (9zh), (9zk), (9r), (9zl), (9zm) o (9zn). En una realización aún más preferida,  $Q^1$  está de acuerdo con la fórmula (9a), (9n), (9o), (9p), (9q), (9t), (9zh) o (9s), y en una realización particularmente preferida,  $Q^1$  está de acuerdo con la fórmula (9a), (9p), (9q), (9n), (9t), (9zh), (9zk) o (9o), y realizaciones preferidas de las mismas, como se han definido anteriormente. Más preferiblemente,  $Q^1$  está de acuerdo con la fórmula (9a), (9p), (9q), (9n), (9t), (9zh) o (9o), y realizaciones preferidas de las mismas, como se han definido anteriormente.

#### Procedimiento para la preparación de un enlazador-conjugado

En esta memoria se describe también un procedimiento para la preparación de un enlazador-conjugado de acuerdo con la invención. En particular, el procedimiento para la preparación de un enlazador-conjugado de acuerdo con la invención, comprende la etapa de hacer reaccionar un grupo funcional  $Q^2$  de un enlazador-estructura artificial con un grupo funcional  $F^2$  de una molécula diana, en donde dicho enlazador-estructura artificial es un compuesto que comprende un extremo alfa y un extremo omega, comprendiendo el compuesto en el extremo alfa un grupo funcional  $Q^1$  capaz de reaccionar con un grupo funcional  $F^1$  presente en una biomolécula, y en el extremo omega un grupo funcional  $Q^2$  capaz de reaccionar con un grupo funcional  $F^2$  presente en dicha molécula diana, en donde el compuesto comprende además un grupo de acuerdo con la fórmula (1), o una de sus sales, en donde dicho grupo de acuerdo con la fórmula (1) es como se ha definido anteriormente, y en donde el grupo de acuerdo con la fórmula (1), o la sal del mismo, está situado entre dicho extremo alfa y dicho extremo omega del compuesto.

El enlazador-estructura artificial y sus realizaciones preferidas, incluyendo las realizaciones preferidas de  $Q^1$ ,  $Q^2$  y la molécula diana  $D$ , se han descrito con detalle anteriormente.

En una realización preferida del procedimiento para la preparación de un enlazador-conjugado, el enlazador-estructura artificial está de acuerdo con  $(Q^1)_y-Sp-(Q^2)_z$  tal y como se ha definido anteriormente. En una realización preferida adicional del procedimiento para la preparación de un enlazador-conjugado, el enlazador-estructura artificial está de acuerdo con  $(Q^1)_y-(Z^w)-Sp-(Z^x)-(Q^2)_z$  tal y como se ha definido anteriormente.

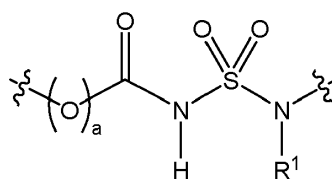
La invención se refiere además al uso de un enlazador de sulfamida-estructura artificial de acuerdo con la invención en un procedimiento de bioconjugación. El enlazador-estructura artificial de acuerdo con la invención, y las realizaciones preferidas, se han descrito con detalle anteriormente. La invención se refiere particularmente al uso de un enlazador-estructura artificial de acuerdo con la fórmula  $(Q^1)_y-Sp-(Q^2)_z$  en un procedimiento de bioconjugación, y al uso de un enlazador-estructura artificial de acuerdo con la fórmula  $(Q^1)_y-(Z^w)-Sp-(Z^x)-(Q^2)_z$  en un procedimiento de bioconjugación.

La invención también se refiere al uso de un enlazador-conjugado de acuerdo con la invención en un procedimiento de bioconjugación. El enlazador-conjugado de acuerdo con la invención, y las realizaciones preferidas, se han descrito con detalle anteriormente. La invención se refiere particularmente al uso de un enlazador-conjugado de acuerdo con la fórmula (4a), (4b), (4c), (4d), (6a), (6b), (7a) o (7b) en un procedimiento de bioconjugación.

Bioconjugado

Un bioconjugado se define en esta memoria como un compuesto en el que una biomolécula está conectada covalentemente con una molécula diana a través de un enlazador. Un bioconjugado comprende una o varias biomoléculas y/o una o varias moléculas diana. El enlazador puede comprender uno o varios restos espaciadores. El bioconjugado de acuerdo con la invención se prepara convenientemente mediante el procedimiento para la preparación de un bioconjugado de acuerdo con la invención, en el que el enlazador-conjugado que comprende el grupo reactivo Q<sup>1</sup> se conjuga con una biomolécula que comprende el grupo reactivo F<sup>1</sup>. En esa reacción de conjugación, los grupos reactivos Q<sup>1</sup> y F<sup>1</sup> reaccionan entre sí para formar un resto enlazador, el cual une el enlazador-conjugado con la biomolécula. Todas las realizaciones preferidas descritas en esta memoria para el enlazador-conjugado y la biomolécula, se aplican por tanto igualmente al bioconjugado de acuerdo con la invención, a excepción de todos los mencionados para Q<sup>1</sup> y F<sup>1</sup>, en donde el bioconjugado de acuerdo con la invención contiene el producto de reacción de Q<sup>1</sup> y F<sup>1</sup> como se ha definido en esta memoria.

La invención también se refiere a un compuesto, en donde el compuesto comprende un extremo alfa y un extremo omega, comprendiendo el compuesto en el extremo alfa una biomolécula y en el extremo omega una molécula diana, en donde el compuesto comprende además un grupo de acuerdo con la fórmula (1) o una sal del mismo:



1

en donde:

a es 0 o 1; y

R<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, en donde los grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> están opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir de O, S y NR<sup>3</sup> en donde R<sup>3</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>; o

R<sup>1</sup> es una molécula diana D, en donde la molécula diana está conectada opcionalmente con N a través de un resto espaciador;

y en donde el grupo de acuerdo con la fórmula (1), o la sal del mismo, está situado entre dicho extremo alfa y dicho extremo omega.

En una realización preferida, el compuesto comprende además un resto que puede obtenerse mediante una reacción de cicloadición, preferiblemente una reacción de cicloadición 1,3-dipolar, lo más preferiblemente un anillo de 1,2,3-triazol, que se localiza entre dicho extremo alfa y dicho grupo de acuerdo con la fórmula (1). En esta memoria, el compuesto comprende por tanto, cuando se visualiza desde el extremo alfa hasta el extremo omega, una biomolécula, un resto que puede obtenerse mediante una reacción de cicloadición, un grupo de acuerdo con la fórmula (1) y una molécula diana.

En una realización preferida adicional, la molécula diana es hidrófoba como se ha definido en esta memoria anteriormente.

Este compuesto de acuerdo con la invención también puede denominarse bioconjugado. Cuando el bioconjugado de acuerdo con la invención comprende una sal del grupo de acuerdo con la fórmula (1), la sal es preferiblemente una sal farmacéuticamente aceptable.

La biomolécula se fija covalentemente al extremo alfa, y la molécula diana se fija covalentemente al extremo omega del bioconjugado de acuerdo con la invención.

El bioconjugado de acuerdo con la invención puede comprender más de una molécula diana. De manera similar, el bioconjugado puede comprender más de una biomolécula. La biomolécula B y la molécula diana D, y sus realizaciones preferidas, se han descrito con más detalle anteriormente. Las realizaciones preferidas para D en el bioconjugado de acuerdo con la invención se corresponden con realizaciones preferidas de D en el enlazador-conjugado de acuerdo con la invención como se han descrito con más detalle anteriormente. Las realizaciones preferidas para el enlazador (8a) o (8b) en el bioconjugado de acuerdo con la invención se corresponden con realizaciones preferidas del enlazador en el enlazador-conjugado de acuerdo con la invención, como se han descrito

con más detalle anteriormente.

En el bioconjugado de acuerdo con la invención, la biomolécula B es una glicoproteína (incluyendo los anticuerpos). Más preferiblemente, la biomolécula B es un anticuerpo.

5 El bioconjugado de acuerdo con la invención también puede definirse como un bioconjugado en el que una biomolécula se conjuga con una molécula diana a través de un resto espaciador, en donde el resto espaciador comprende un grupo de acuerdo con la fórmula (1), o una de sus sales, en donde el grupo de acuerdo con la fórmula (1) es como se ha definido anteriormente.

El bioconjugado de acuerdo con la invención también se puede denominar  $(B)_y\text{-Sp-(D)}_z$ , en donde y es un número entero en el intervalo de 1 a 10 y z es un número entero en el intervalo de 1 a 10.

10 Por lo tanto, la invención también se refiere a un bioconjugado de acuerdo con la fórmula:



en donde:

y es un número entero en el intervalo de 1 a 10;

z es un número entero en el intervalo de 1 a 10;

15 B es una biomolécula;

D es una molécula diana;

Sp es un resto espaciador, en donde un resto espaciador se define como un resto que separa (es decir, proporciona una cierta distancia entre) y une covalentemente una biomolécula B y una molécula diana D; y

20 en donde dicho resto espaciador comprende un grupo de acuerdo con la fórmula (1) o una de sus sales, en donde el grupo de acuerdo con la fórmula (1) es como se ha definido anteriormente.

En una realización preferida, dicho resto espaciador comprende además un resto que puede obtenerse mediante una reacción de cicloadición, preferiblemente una reacción de cicloadición 1,3-dipolar, lo más preferiblemente un anillo de 1,2,3-triazol, que se localiza entre B y dicho grupo de acuerdo con la fórmula (1).

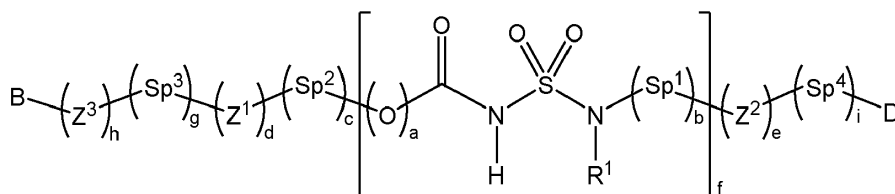
25 Preferiblemente, y es 1, 2, 3 o 4, más preferiblemente y es 1 o 2 y lo más preferiblemente, y es 1. Preferiblemente, z es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, más preferiblemente z es 1, 2, 3 o 4, incluso más preferiblemente z es 1, 2 o 3, aún más preferiblemente z es 1 o 2 y lo más preferiblemente z es 1. Más preferiblemente, y es 1 o 2, preferiblemente 1, y z es 1, 2, 3 o 4, pero aún más preferiblemente y es 1 o 2, preferiblemente 1, y z es 1, 2 o 3, y aún más preferiblemente y es 1 o 2, preferiblemente 1, y z es 1 o 2, y lo más preferiblemente y es 1 y z es 1. En una realización preferida, el bioconjugado está de acuerdo con la fórmula  $B\text{-Sp-(D)}_4$ ,  $B\text{-Sp-(D)}_3$ ,  $B\text{-Sp-(D)}_2$  o  $B\text{-Sp-D}$ .

30 Como se ha descrito anteriormente, el bioconjugado de acuerdo con la invención comprende un grupo de acuerdo con la fórmula (1) como se ha definido anteriormente, o una sal del mismo. En una realización preferida, el bioconjugado comprende un grupo de acuerdo con la fórmula (1) en donde a es 0, o una sal del mismo. En esa realización, el bioconjugado comprende por tanto un grupo de acuerdo con la fórmula (2) o una sal del mismo, en donde (2) es como se ha definido anteriormente.

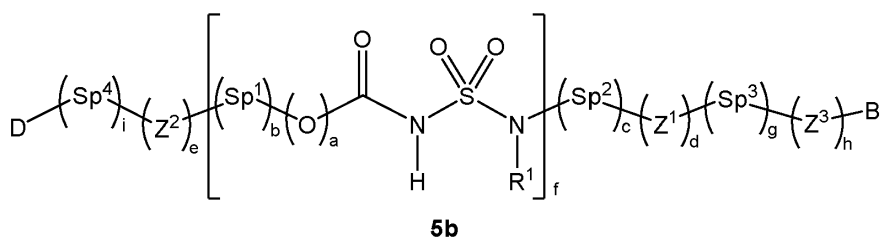
35 En otra realización preferida, el bioconjugado comprende un grupo de acuerdo con la fórmula (1) en donde a es 1, o una sal del mismo. En esa realización, el bioconjugado comprende por tanto un grupo de acuerdo con la fórmula (3) o una sal del mismo, en donde (3) es como se ha definido anteriormente.

En el bioconjugado de acuerdo con la invención,  $R^1$ , el resto espaciador Sp, así como realizaciones preferidas de  $R^1$  y Sp, son como se han definido anteriormente para el enlazador-conjugado de acuerdo con la invención.

40 En una realización preferida, el bioconjugado está de acuerdo con la fórmula (5a) o (5b), o una de sus sales:



5a



en donde a, b, c, d, e, f, g, h, i, D, Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup>, Sp<sup>4</sup>, Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup>, Z<sup>3</sup> y R<sup>1</sup>, y sus realizaciones preferidas, son como se han definido anteriormente para el enlazador-conjugado (4a) y (4b); y

h es 0 o 1;

5 Z<sup>3</sup> es un grupo de conexión que conecta B con Sp<sup>3</sup>, Z<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, O o C(O); y

B es una biomolécula.

Preferiblemente, h es 1.

Las realizaciones preferidas de la biomolécula B son como se han definido anteriormente.

10 Cuando el bioconjugado de acuerdo con la invención es una sal de (5a) o (5b), la sal es preferiblemente una sal farmacéuticamente aceptable.

Z<sup>3</sup> es un grupo de conexión. Como se ha descrito anteriormente, la expresión "grupo de conexión" en esta memoria se refiere al elemento estructural que conecta una parte de un compuesto y otra parte del mismo compuesto. Normalmente, un bioconjugado se prepara a través de una reacción de un grupo reactivo Q<sup>1</sup> presente en un enlazador-conjugado con un grupo funcional F<sup>1</sup> presente en una biomolécula. Como entenderá el experto en la materia, la naturaleza del grupo de conexión Z<sup>3</sup> depende del tipo de reacción orgánica que se haya utilizado para establecer la conexión entre una biomolécula y un enlazador-conjugado. En otras palabras, la naturaleza de Z<sup>3</sup> depende de la naturaleza del grupo reactivo Q<sup>1</sup> del enlazador-conjugado y de la naturaleza del grupo funcional F<sup>1</sup> en la biomolécula. Dado que hay un gran número de reacciones químicas diferentes disponibles para establecer la conexión entre una biomolécula y un enlazador-conjugado, en consecuencia, hay una gran cantidad de posibilidades para Z<sup>3</sup>.

Varios ejemplos de combinaciones adecuadas de F<sup>1</sup> y Q<sup>1</sup>, y del grupo de conexión Z<sup>3</sup> que estará presente en un bioconjugado cuando un enlazador-conjugado que comprende Q<sup>1</sup> se conjuga con una biomolécula que comprende un grupo funcional F<sup>1</sup> complementario, se muestran en la Figura 22.

25 Cuando F<sup>1</sup> es por ejemplo un grupo tiol, los grupos complementarios Q<sup>1</sup> incluyen grupos N-maleimidilo y grupos alquenilo, y los grupos de conexión Z<sup>3</sup> correspondientes son como se muestran en la Figura 22. Cuando F<sup>1</sup> es un grupo tiol, los grupos complementarios Q<sup>1</sup> también incluyen grupos de alenamida.

Cuando F<sup>1</sup> es, por ejemplo, un grupo amino, los grupos complementarios Q<sup>1</sup> incluyen grupos cetona, grupos éster activados y grupos azido, y los grupos de conexión Z<sup>3</sup> correspondientes son como se muestra en la Figura 22.

30 Cuando F<sup>1</sup> es, por ejemplo, un grupo cetona, los grupos complementarios Q<sup>1</sup> incluyen grupos (O-alquil)hidroxilamino y grupos hidrazina, y los grupos de conexión Z<sup>3</sup> correspondientes son como se muestra en la Figura 22.

Cuando F<sup>1</sup> es, por ejemplo, un grupo alquinilo, los grupos complementarios Q<sup>1</sup> incluyen grupos azido, y el grupo de conexión Z<sup>3</sup> correspondiente es como se muestra en la Figura 22.

Cuando F<sup>1</sup> es, por ejemplo, un grupo azido, los grupos complementarios Q<sup>1</sup> incluyen grupos alquinilo, y el grupo de conexión Z<sup>3</sup> correspondiente es como se muestra en la Figura 22.

35 Cuando F<sup>1</sup> es, por ejemplo, un grupo ciclopropenilo, un grupo *trans*-cicloocteno o un grupo ciclooctino, los grupos complementarios Q<sup>1</sup> incluyen grupos tetrazinilo y el grupo de conexión Z<sup>3</sup> correspondiente es como se muestra en la Figura 22. En estos casos particulares, Z<sup>3</sup> es solo una estructura intermedia y expulsará N<sub>2</sub>, generando de este modo una dihidropiridazina (a partir de la reacción con alqueno) o piridazina (a partir de la reacción con alquino).

40 Las combinaciones adicionales adecuadas de F<sup>1</sup> y Q<sup>1</sup> y la naturaleza del grupo de conexión resultante Z<sup>3</sup> son conocidas por los expertos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en G.T. Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Elsevier, 3<sup>a</sup> ed. 2013 (ISBN:978-0-12-382239-0), en particular en el Capítulo 3, páginas 229-258. Una lista de los grupos reactivos complementarios adecuados para procesos de bioconjugación, se describe en la Tabla 3.1, páginas 230-232 del capítulo 3 de G.T. Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Elsevier, 3<sup>a</sup> ed. 2013 (ISBN:978-0-12-382239-0).

45

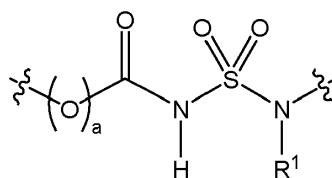
En el bioconjugado de acuerdo con (5a) y (5b), es preferible que al menos uno de  $Z^3$ ,  $Sp^3$ ,  $Z^1$  y  $Sp^2$  esté presente, es decir, al menos uno de h, g, d y c no sea 0. También se prefiere que al menos uno de  $Sp^1$ ,  $Z^2$  y  $Sp^4$  esté presente, es decir, que al menos uno de b, e e i no sea 0. Más preferiblemente, al menos uno de  $Z^3$ ,  $Sp^3$ ,  $Z^1$  y  $Sp^2$  está presente y al menos uno de  $Sp^1$ ,  $Z^2$  y  $Sp^4$  está presente, es decir, se prefiere que al menos uno de b, e e i no sea 0 y al menos uno de h, g, d y c no sea 0.

Procedimiento para la preparación de un bioconjugado.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para la preparación de un bioconjugado, en donde el procedimiento comprende la etapa de hacer reaccionar un grupo reactivo  $Q^1$  de un enlazador-conjugado con un grupo funcional  $F^1$  de una glicoproteína. Las realizaciones preferidas del enlazador-conjugado se han descrito con más detalle anteriormente.

La Figura 1 muestra el concepto general de conjugación de biomoléculas: una biomolécula de interés (BOI) que comprende uno o varios grupos funcionales  $F^1$  se incubaba con (un exceso de) una molécula diana D (también conocida como molécula de interés o MOI) fijada covalentemente a un grupo reactivo  $Q^1$  a través de un enlazador específico. En el procedimiento de bioconjugación, tiene lugar una reacción química entre  $F^1$  y  $Q^1$ , formándose de este modo un bioconjugado que comprende un enlace covalente entre la BOI y la MOI. En el procedimiento de acuerdo con la invención, el enlazador es un enlazador de sulfamida.

La presente invención se refiere de este modo a un procedimiento para la preparación de un bioconjugado, comprendiendo el procedimiento la etapa de hacer reaccionar un grupo reactivo  $Q^1$  de un enlazador-conjugado con un grupo funcional  $F^1$  de una glicoproteína, en donde el enlazador-conjugado es un compuesto que comprende un extremo alfa y un extremo omega, comprendiendo el compuesto en el extremo alfa un grupo reactivo  $Q^1$  capaz de reaccionar con un grupo funcional  $F^1$  presente en la glicoproteína y en el extremo omega, una molécula diana seleccionada a partir del grupo que consiste en un fármaco, un profármaco, un agente de diagnóstico, una proteína, un péptido, un polipéptido, un marcador peptídico, un aminoácido, un glicano, un lípido, una vitamina, un esteroide, un nucleótido, un nucleósido, un polinucleótido, un ARN, un ADN, una molécula informadora, un polímero, una superficie sólida, un hidrogel, una nanopartícula, una micropartícula y una biomolécula, en donde  $Q^1$  es un grupo reactivo seleccionado a partir del grupo que consiste en grupos N-maleimidilo opcionalmente sustituidos, grupos N-alquilamido halogenados, grupos éster activados, grupos tiol, grupos alquinilo, grupos (hetero)cicloalquinilo, grupos tetrazinilo, grupos azido, grupos fosfina, grupos 1,1-bis(sulfonilmetil)-metilcarbonilo, grupos 1,2-quinona o grupos triazina, en donde el compuesto comprende además un grupo de acuerdo con la fórmula (1) o una sal del mismo:



1

en donde:

a es 0 o 1; y

$R^1$  se selecciona a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo  $C_1 - C_{24}$ , grupos cicloalquilo  $C_3 - C_{24}$ , grupos (hetero)arilo  $C_2 - C_{24}$ , grupos alquil(hetero)arilo  $C_3 - C_{24}$  y grupos (hetero)arilalquilo  $C_3 - C_{24}$ , en donde los grupos alquilo  $C_1 - C_{24}$ , grupos cicloalquilo  $C_3 - C_{24}$ , grupos (hetero)arilo  $C_2 - C_{24}$ , grupos alquil(hetero)arilo  $C_3 - C_{24}$  y grupos (hetero)arilalquilo  $C_3 - C_{24}$  están opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir de O, S y  $NR^3$  en donde  $R^3$  se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno y grupos alquilo  $C_1 - C_4$ , o  $R^1$  es una molécula diana D, en donde la molécula diana está conectada opcionalmente con N a través de un resto espaciador;

y en donde el grupo de acuerdo con la fórmula (1), o la sal del mismo, está situado entre dicho extremo alfa y dicho extremo omega del enlazador-conjugado.

En una realización preferida, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un bioconjugado a través de una cicloadición, tal como una cicloadición (4+2) (por ejemplo, una reacción de Diels-Alder) o una cicloadición (3+2) (por ejemplo, una cicloadición 1,3-dipolar). Preferiblemente, la conjugación es la reacción de Diels-Alder o la cicloadición 1,3-dipolar. La reacción preferida de Diels-Alder es la cicloadición de Diels-Alder con demanda inversa de electrones. En otra realización preferida, se usa la cicloadición 1,3-dipolar, más preferiblemente la cicloadición de alquino-azida, y lo más preferiblemente cuando  $Q^1$  es o comprende un grupo alquino y  $F^1$  es un grupo azido. Las cicloadiciones, tales como las reacciones de Diels-Alder y las cicloadiciones 1,3-dipolares, son conocidas en la técnica, y los expertos en la materia saben cómo realizarlas. En una realización preferida adicional, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un bioconjugado, en donde la molécula diana es

hidrófoba (es decir, débilmente soluble en agua), más preferiblemente en donde la molécula diana tiene una solubilidad en agua de a lo sumo 0,1% (p/p) en agua (20°C y 100 kPa). En una realización especialmente preferida, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un bioconjugado a través de una cicloadición, preferiblemente una cicloadición 1,3-dipolar, más preferiblemente la cicloadición de alquino-azida, y lo más preferiblemente cuando Q<sup>1</sup> es o comprende un grupo alquino y F<sup>1</sup> es un grupo azido, y en donde la molécula diana es hidrófoba, lo más preferiblemente cuando la molécula diana tiene una solubilidad en agua de, como máximo, el 0,1% (p/p) en agua (20°C y 100 kPa).

En el procedimiento de acuerdo con la invención, Q<sup>1</sup> reacciona con F<sup>1</sup>, formando una conexión covalente entre la biomolécula y el resto enlazador. Los grupos reactivos complementarios Q<sup>1</sup> y los grupos funcionales F<sup>1</sup> se han descrito con más detalle anteriormente y a continuación.

En una realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, a es 0 en el grupo de acuerdo con la fórmula (1). En esa realización, el enlazador-conjugado comprende de este modo un grupo de acuerdo con la fórmula (2), como se ha definido anteriormente. En otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, a es 1 en el grupo de acuerdo con la fórmula (1). En esa realización, el enlazador-conjugado comprende de este modo un grupo de acuerdo con la fórmula (3), como se ha definido anteriormente.

Las biomoléculas se han descrito con más detalle anteriormente. En el procedimiento de acuerdo con la invención, la biomolécula se selecciona a partir del grupo que consiste en glicoproteínas, incluyendo los anticuerpos.

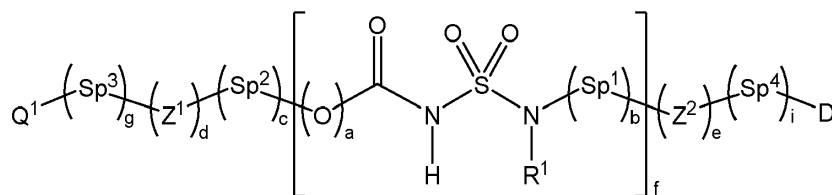
Las moléculas diana se han descrito con más detalle anteriormente. En el procedimiento de acuerdo con la invención, la molécula diana se selecciona a partir del grupo que consiste en una sustancia activa seleccionada a partir de un fármaco, un profármaco, un agente de diagnóstico, una proteína, un péptido, un polipéptido, un marcador peptídico, un aminoácido, un glicano, un lípido, una vitamina, un esteroide, un nucleótido, un nucleósido, un polinucleótido, ARN y ADN, una molécula informadora, un polímero, una superficie sólida, un hidrogel, una nanopartícula, una micropartícula y una biomolécula. Las sustancias activas, las moléculas informadoras, los polímeros, las superficies sólidas, los hidrogeles, las nanopartículas y las micropartículas se han descrito con detalle anteriormente, al igual que sus realizaciones preferidas. Debido a la solubilidad en agua significativamente mejorada del enlazador-conjugado cuando se emplea el enlazador de sulfamida de acuerdo con la invención, una realización preferida del procedimiento para la preparación de un bioconjugado, emplea una molécula diana hidrófoba. La molécula diana hidrófoba en su forma no conjugada normalmente tiene una solubilidad en agua de a lo sumo 1% (p/p), preferiblemente a lo sumo 0,1% (p/p), lo más preferiblemente a lo sumo 0,01% (p/p), determinada a 20°C y 100 kPa.

En el procedimiento de acuerdo con la invención, el grupo reactivo Q<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en grupos N-maleimidilo sustituidos opcionalmente, grupos N-alquilamido halogenados, grupos éster activados, grupos tiol, grupos alquinilo, grupos (hetero)cicloalquinilo, grupos tetrazinilo, grupos azido, grupos fosfina, grupos 1,1-bis(sulfonilmetil)-metilcarbonilo, grupos 1,2-quinona o grupos triazina.

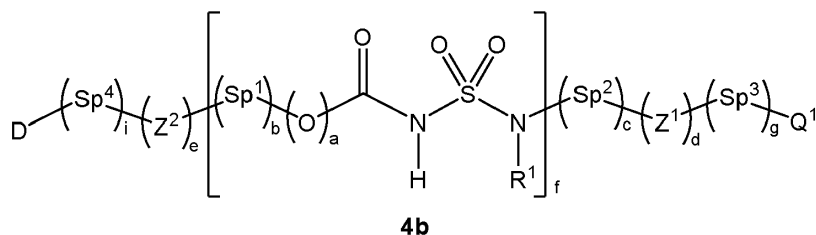
En una realización preferida adicional, Q<sup>1</sup> está de acuerdo con la fórmula (9a), (9b), (9c), (9f), (9g), (9h), (9j), (9n), (9o), (9p), (9q), (9r), (9s), (9t), (9zb), (9zh), (9zl), (9zm) o (9zn), en donde (9a), (9b), (9c), (9f), (9g), (9h), (9j), (9n), (9o), (9p), (9q), (9r), (9s), (9t), (9zb), (9zh), (9zk), (9zl), (9zm), (9zn) y realizaciones preferidas de las mismas, como se han definido anteriormente para el enlazador-conjugado de acuerdo con la invención. Más preferiblemente, Q<sup>1</sup> está de acuerdo con la fórmula (9a), (9n), (9o), (9p), (9q), (9t), (9zh) o (9s), y lo más preferiblemente, Q<sup>1</sup> está de acuerdo con la fórmula (9a), (9p), (9q), (9n), (9t), (9zh) o (9o), y realizaciones preferidas de las mismas, como se han definido anteriormente.

En una realización especialmente preferida, Q<sup>1</sup> comprende un grupo alquino, preferiblemente seleccionado a partir del grupo alquinilo tal y como se ha descrito anteriormente, el grupo cicloalqueno tal y como se ha descrito anteriormente, el grupo (hetero)cicloalquinilo tal y como se ha descrito anteriormente y un grupo biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo], más preferiblemente Q<sup>1</sup> se selecciona a partir de las fórmulas (9j), (9n), (9o), (9p), (9q) y (9zk), tal y como se han definido anteriormente. Más preferiblemente, Q<sup>1</sup> es un grupo biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo], preferiblemente de fórmula (9q).

En una realización preferida adicional del procedimiento de acuerdo con la invención, el enlazador-conjugado está de acuerdo con la fórmula (4a) o (4b), o una sal de las mismas:



4a



en donde:

a es independientemente 0 o 1;

b es independientemente 0 o 1;

5 c es 0 o 1;

d es 0 o 1;

e es 0 o 1;

f es un número entero en el intervalo de 1 a 150;

g es 0 o 1;

10 i es 0 o 1;

D es una molécula diana;

Q<sup>1</sup> es un grupo reactivo capaz de reaccionar con un grupo funcional F<sup>1</sup> presente en una biomolécula;

Sp<sup>1</sup> es un resto espaciador;

Sp<sup>2</sup> es un resto espaciador;

15 Sp<sup>3</sup> es un resto espaciador;

Sp<sup>4</sup> es un resto espaciador;

Z<sup>1</sup> es un grupo de conexión que conecta Q<sup>1</sup> o Sp<sup>3</sup> con Sp<sup>2</sup>, O o C(O) o N(R<sup>1</sup>);

Z<sup>2</sup> es un grupo de conexión que conecta D o Sp<sup>4</sup> con Sp<sup>1</sup>, N(R<sup>1</sup>), O o C(O); y

20 R<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, en donde los grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> están opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir de O, S y NR<sup>3</sup> en donde R<sup>3</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>, o

25 R<sup>1</sup> es D, -[(Sp<sup>1</sup>)<sub>b</sub>-(Z<sup>2</sup>)<sub>e</sub>-(Sp<sup>4</sup>)<sub>i</sub>-D] o -[(Sp<sup>2</sup>)<sub>c</sub>-(Z<sup>1</sup>)<sub>d</sub>-(Sp<sup>3</sup>)<sub>g</sub>-Q<sup>1</sup>], en donde Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup>, Sp<sup>4</sup>, Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup>, D, Q<sup>1</sup>, b, c, d, e, g e i son como se han definido anteriormente.

30 Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup> y Sp<sup>4</sup> son, independientemente, restos espaciadores, en otras palabras, Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup> y Sp<sup>4</sup> pueden diferir unos de otros Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup> y Sp<sup>4</sup> pueden estar presentes o ausentes (b, c, g e i son, independientemente, 0 o 1). Sin embargo, se prefiere que al menos uno de Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup> y Sp<sup>4</sup> esté presente, es decir, se prefiere que al menos uno de b, c, g e i no sea 0.

35 Si está presente, preferiblemente Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup> y Sp<sup>4</sup> se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en grupos alquilenos C<sub>1</sub> - C<sub>200</sub> lineales o ramificados, grupos alquenileno C<sub>2</sub> - C<sub>200</sub>, grupos alquinileno C<sub>2</sub> - C<sub>200</sub>, grupos cicloalquilenos C<sub>3</sub> - C<sub>200</sub>, grupos cicloalquenileno C<sub>5</sub> - C<sub>200</sub>, grupos cicloalquinileno C<sub>8</sub> - C<sub>200</sub>, grupos alquilarileno C<sub>7</sub> - C<sub>200</sub>, grupos arilalquilenos C<sub>7</sub> - C<sub>200</sub>, grupos arilalquenileno C<sub>8</sub> - C<sub>200</sub> y grupos arilalquinileno C<sub>9</sub> - C<sub>200</sub>, en donde los grupos alquilenos, los grupos alquenileno, los grupos alquinileno, los grupos cicloalquilenos, los grupos cicloalquenileno, los grupos cicloalquinileno, los grupos alquilarileno, los grupos arilalquilenos, los grupos arilalquenileno y los grupos arilalquinileno están opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo de O, S y NR<sup>3</sup>, en donde R<sup>3</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquenilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquinilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub> y grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, en donde los grupos alquilo, los grupos alquenilo, los grupos alquinilo y los grupos cicloalquilo están opcionalmente sustituidos. Cuando los grupos alquilenos, los grupos alquenileno, los grupos

40



alquinileno, los grupos cicloalquileno, los grupos cicloalquenileno, los grupos cicloalquinileno, los grupos alquilarileno, los grupos arilalquileno, los grupos arilalquenileno y los grupos arilalquinileno están interrumpidos por uno o varios heteroátomos como se ha definido anteriormente, se prefiere que dichos grupos estén interrumpidos por uno o varios átomos de O, y/o por uno o varios grupos S-S.

5 Más preferiblemente, los restos espaciadores  $Sp^1$ ,  $Sp^2$ ,  $Sp^3$  y  $Sp^4$ , si están presentes, se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en grupos alquileno  $C_1 - C_{100}$  lineales o ramificados, grupos alquenileno  $C_2 - C_{100}$ , grupos alquinileno  $C_2 - C_{100}$ , grupos cicloalquileno  $C_3 - C_{100}$ , grupos cicloalquenileno  $C_5 - C_{100}$ , grupos cicloalquinileno  $C_8 - C_{100}$ , grupos alquilarileno  $C_7 - C_{100}$ , grupos arilalquileno  $C_7 - C_{100}$ , grupos arilalquenileno  $C_8 - C_{100}$  y grupos arilalquinileno  $C_9 - C_{100}$ , en donde los grupos alquileno, los grupos alquenileno, los grupos alquinileno, los grupos cicloalquileno, los grupos cicloalquenileno, los grupos cicloalquinileno, los grupos alquilarileno, los grupos arilalquileno, los grupos arilalquenileno y los grupos arilalquinileno están opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo de O, S y  $NR^3$ , en donde  $R^3$  se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo  $C_1 - C_{24}$ , grupos alquenilo  $C_2 - C_{24}$ , grupos alquinilo  $C_2 - C_{24}$  y grupos cicloalquilo  $C_3 - C_{24}$ , en donde los grupos alquilo, los grupos alquenilo, los grupos alquinilo y los grupos cicloalquilo están opcionalmente sustituidos.

Aún más preferentemente, los restos espaciadores  $Sp^1$ ,  $Sp^2$ ,  $Sp^3$  y  $Sp^4$ , si están presentes, se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en grupos alquileno  $C_1 - C_{50}$  lineales o ramificados, grupos alquenileno  $C_2 - C_{50}$ , grupos alquinileno  $C_2 - C_{50}$ , grupos cicloalquileno  $C_3 - C_{50}$ , grupos cicloalquenileno  $C_5 - C_{50}$ , grupos cicloalquinileno  $C_8 - C_{50}$ , grupos alquilarileno  $C_7 - C_{50}$ , grupos arilalquileno  $C_7 - C_{50}$ , grupos arilalquenileno  $C_8 - C_{50}$  y grupos arilalquinileno  $C_9 - C_{50}$ , en donde los grupos alquileno, los grupos alquenileno, los grupos alquinileno, los grupos cicloalquileno, los grupos cicloalquenileno, los grupos cicloalquinileno, los grupos alquilarileno, los grupos arilalquileno, los grupos arilalquenileno y los grupos arilalquinileno están opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo de O, S y  $NR^3$ , en donde  $R^3$  se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo  $C_1 - C_{24}$ , grupos alquenilo  $C_2 - C_{24}$ , grupos alquinilo  $C_2 - C_{24}$  y grupos cicloalquilo  $C_3 - C_{24}$ , en donde los grupos alquilo, los grupos alquenilo, los grupos alquinilo y los grupos cicloalquilo están opcionalmente sustituidos.

Aún más preferiblemente, los restos espaciadores  $Sp^1$ ,  $Sp^2$ ,  $Sp^3$  y  $Sp^4$ , si están presentes, se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en grupos alquileno  $C_1 - C_{20}$  lineales o ramificados, grupos alquenileno  $C_2 - C_{20}$ , grupos alquinileno  $C_2 - C_{20}$ , grupos cicloalquileno  $C_3 - C_{20}$ , grupos cicloalquenileno  $C_5 - C_{20}$ , grupos cicloalquinileno  $C_8 - C_{20}$ , grupos alquilarileno  $C_7 - C_{20}$ , grupos arilalquileno  $C_7 - C_{20}$ , grupos arilalquenileno  $C_8 - C_{20}$  y grupos arilalquinileno  $C_9 - C_{20}$ , en donde los grupos alquileno, los grupos alquenileno, los grupos alquinileno, los grupos cicloalquileno, los grupos cicloalquenileno, los grupos cicloalquinileno, los grupos alquilarileno, los grupos arilalquileno, los grupos arilalquenileno y los grupos arilalquinileno están opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo de O, S y  $NR^3$ , en donde  $R^3$  se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo  $C_1 - C_{24}$ , grupos alquenilo  $C_2 - C_{24}$ , grupos alquinilo  $C_2 - C_{24}$  y grupos cicloalquilo  $C_3 - C_{24}$ , en donde los grupos alquilo, los grupos alquenilo, los grupos alquinilo y los grupos cicloalquilo están opcionalmente sustituidos.

En esas realizaciones preferidas, se prefiere adicionalmente que los grupos alquileno, los grupos alquenileno, los grupos alquinileno, los grupos cicloalquileno, los grupos cicloalquenileno, los grupos cicloalquinileno, los grupos alquileno, los grupos arilalquileno, los grupos arilalquenileno y los grupos arilalquinileno estén opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo de O, S y  $NR^3$ , preferiblemente O, en donde  $R^3$  se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno y grupos alquilo  $C_1 - C_4$ , preferiblemente hidrógeno o metilo.

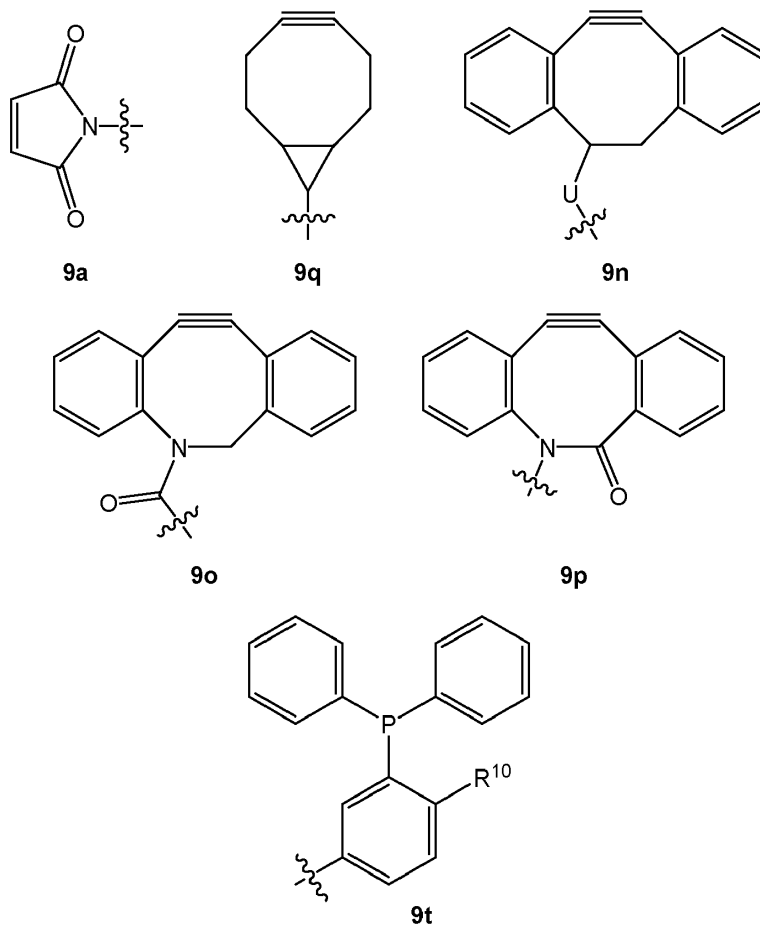
Lo más preferiblemente, los restos espaciadores  $Sp^1$ ,  $Sp^2$ ,  $Sp^3$  y  $Sp^4$ , si están presentes, se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en grupos alquileno  $C_1 - C_{20}$  lineales o ramificados, en donde los grupos alquileno están opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo de O, S y  $NR^3$ , en donde  $R^3$  se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo  $C_1 - C_{24}$ , grupos alquenilo  $C_2 - C_{24}$ , grupos alquinilo  $C_2 - C_{24}$  y grupos cicloalquilo  $C_3 - C_{24}$ , en donde los grupos alquilo, los grupos alquenilo, los grupos alquinilo y los grupos cicloalquilo están opcionalmente sustituidos. En esa realización, se prefiere además que los grupos alquileno no estén sustituidos y estén opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo de O, S y  $NR^3$ , preferiblemente O y/o S-S, en donde  $R^3$  se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno y grupos alquilo  $C_1 - C_4$ , preferiblemente hidrógeno o metilo.

Los restos espaciadores particularmente preferidos  $Sp^1$ ,  $Sp^2$ ,  $Sp^3$  y  $Sp^4$  incluyen  $-(CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2CH_2O)_n-$ ,  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$ ,  $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2CH_2CH_2O)_n-$ ,  $-(OCH_2CH_2CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2CH_2-$  y  $-CH_2CH_2CH_2(OCH_2CH_2CH_2)_n-$ , en donde n es un número entero en el intervalo de 1 a 50, preferiblemente en el intervalo de 1 a 40, más preferiblemente en el intervalo de 1 a 30, aún más preferiblemente en el intervalo de 1 a 20 e incluso más preferiblemente en el intervalo de 1 a 15. Más preferiblemente n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, incluso más preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5 o 6, y todavía más preferiblemente 1, 2, 3 o 4.

En otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, en los enlazadores-conjugados de acuerdo con la fórmula (4a) y (4b), los restos espaciadores  $Sp^1$ ,  $Sp^2$ ,  $Sp^3$  y/o  $Sp^4$ , si están presentes, comprenden una secuencia de aminoácidos. Los restos espaciadores que comprenden una secuencia de aminoácidos son conocidos en la técnica, y también pueden denominarse enlazadores peptídicos. Los ejemplos incluyen restos espaciadores que comprenden un resto Val-Cit, p. ej., val-cit-PABC, val-cit-PAB, Fmoc-val-cit-PAB, etc.

Como se ha descrito anteriormente,  $Z^1$  y  $Z^2$  son grupos de conexión. En una realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención,  $Z^1$  y  $Z^2$  se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en -O-, -S-, -NR<sup>2</sup>-, -N=N-, -C(O)-, -C(O)NR<sup>2</sup>-, -O-C(O)-, -O-C(O)-O-, -O-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sub>2</sub>-C(O)-, -NR<sup>2</sup>-C(O)-O-, -NR<sup>2</sup>-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -S-C(O)-, -S-C(O)-O-, -S-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -O-S(O)<sub>2</sub>-, -O-S(O)<sub>2</sub>-O-, -O-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>2</sup>-, -O-S(O)-, -O-S(O)-O-, -O-S(O)-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-C(O)-, -O-NR<sup>2</sup>-C(O)-O-, -O-NR<sup>2</sup>-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-O-C(O)-, -NR<sup>2</sup>-O-C(O)-O-, -NR<sup>2</sup>-O-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-C(S)-, -O-NR<sup>2</sup>-C(S)-O-, -O-NR<sup>2</sup>-C(S)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-O-C(S)-, -NR<sup>2</sup>-O-C(S)-O-, -NR<sup>2</sup>-O-C(S)-NR<sup>2</sup>-, -O-C(S)-O-, -O-C(S)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-C(S)-, -NR<sup>2</sup>-C(S)-O-, -NR<sup>2</sup>-C(S)-NR<sup>2</sup>-, -S-S(O)<sub>2</sub>-, -S-S(O)<sub>2</sub>-O-, -S-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)-O-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)<sub>2</sub>-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)<sub>2</sub>-O-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)-O-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)<sub>2</sub>-O-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>2</sup>-, -O-P(O)(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub>-, -S-P(O)(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub>-, -NR<sup>2</sup>-P(O)(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub>- y combinaciones de dos o más de los mismos, en donde R<sup>2</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alqueno C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquino C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub> y grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, en donde los grupos alquilo, los grupos alqueno, los grupos alquino y los grupos cicloalquilo están opcionalmente sustituidos.

En un procedimiento particularmente preferido de acuerdo con la invención,  $Sp^1$ ,  $Sp^2$ ,  $Sp^3$  y  $Sp^4$ , si están presentes, se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en grupos alqueno C<sub>1</sub> - C<sub>20</sub> lineales o ramificados, estando los grupos alqueno opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo que consiste en O, S y NR<sup>3</sup>, en donde R<sup>3</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>, y en donde Q<sup>1</sup> está de acuerdo con la fórmula (9a), (9p), (9q), (9n), (9t) o (9o):



en donde:

R<sup>10</sup> es hidrógeno o un grupo (tio)éster.

30 Como se ha descrito anteriormente, en el procedimiento para la preparación de un bioconjugado, un grupo reactivo Q<sup>1</sup> que está presente en un enlazador-conjugado reacciona con un grupo funcional F<sup>1</sup> que está presente en una

glicoproteína. En el procedimiento de acuerdo con la invención, más de un grupo funcional puede estar presente en la glicoproteína. Cuando dos o más grupos funcionales están presentes, dichos grupos pueden ser iguales o diferentes. De manera similar, más de un grupo reactivo puede estar presente en el enlazador-conjugado. Cuando dos o más grupos reactivos están presentes, dichos grupos pueden ser iguales o diferentes. En una realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, el enlazador-conjugado comprende un grupo reactivo Q<sup>1</sup> y una o varias moléculas dianas D que pueden ser iguales o diferentes. El enlazador-conjugado comprende, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, preferiblemente 1, 2, 3 o 4, más preferiblemente 1, 2 o 3, incluso más preferiblemente 1 o 2 moléculas diana D. En una realización particularmente preferida, el enlazador-conjugado comprende 1 molécula diana D. En otra realización particularmente preferida, el enlazador-conjugado comprende 2 moléculas dianas D, que pueden ser iguales o diferentes. En otra realización preferida, la glicoproteína comprende dos o más grupos funcionales F, que pueden ser iguales o diferentes, y dos o más grupos funcionales reaccionan con un grupo reactivo complementario Q de un enlazador-conjugado. Por ejemplo, una glicoproteína que comprende dos grupos funcionales F, es decir, F<sup>1</sup> y F<sup>2</sup>, puede reaccionar con dos enlazadores-conjugados que comprenden un grupo funcional Q<sup>1</sup>, que pueden ser iguales o diferentes, para formar un bioconjugado.

Ejemplos de un grupo funcional F<sup>1</sup> en una glicoproteína comprenden un grupo amino, un grupo tiol, un ácido carboxílico, un grupo alcohol, un grupo carbonilo, un grupo fosfato o un grupo aromático. El grupo funcional en la glicoproteína puede estar presente de forma natural o se puede situar en la glicoproteína mediante una técnica específica, por ejemplo, una técnica (bio)química o genética. El grupo funcional que se sitúa en la glicoproteína puede ser un grupo funcional que está presente en la naturaleza de forma natural, o puede ser un grupo funcional que se prepara por síntesis química, por ejemplo una azida, un alquino terminal, un resto ciclopropeno o un resto fosfina. Debido al modo preferido de conjugación mediante cicloadición, se prefiere que F<sup>1</sup> sea un grupo capaz de reaccionar en una cicloadición, tal como un dieno, un dienófilo, un dipolo 1,3 o un dipolarófilo, preferiblemente F<sup>1</sup> se selecciona a partir de un dipolo 1,3 (normalmente un grupo azido, un grupo nitrona, un grupo óxido de nitrilo, un grupo nitrilo imina o un grupo diazo) o un dipolarófilo (normalmente un grupo alquenilo o alquinilo). En esta memoria, F<sup>1</sup> es un dipolo 1,3 cuando Q<sup>1</sup> es un dipolarófilo y F<sup>1</sup> es un dipolarófilo cuando Q<sup>1</sup> es un dipolo 1,3, o F<sup>1</sup> es un dieno cuando Q<sup>1</sup> es un dienófilo y F<sup>1</sup> es un dienófilo cuando Q<sup>1</sup> es un dieno. Lo más preferiblemente, F<sup>1</sup> es un dipolo 1,3, preferiblemente F<sup>1</sup> es o comprende un grupo azido.

En la Figura 2 se muestran varios ejemplos de un grupo funcional que se sitúa en una glicoproteína. La Figura 2 muestra varias estructuras de derivados de azúcares UDP de galactosamina, que pueden modificarse, p. ej., un grupo tiopropionilo (**11a**), un grupo azidoacetilo (**11b**) o un grupo azidodifluoroacetilo (**11c**).

La Figura 3 muestra esquemáticamente cómo cualquiera de los azúcares UDP **11a-c** se puede fijar a una glicoproteína que comprende un resto GlcNAc **12** (p. ej., un anticuerpo monoclonal cuyo glicano está recortado por una endoglicosidasa) bajo la acción de un mutante de galactosiltransferasa o GalNAc-transferasa, generando de este modo un enlace β-glicosídico 1-4 entre un derivado de GalNAc y GlcNAc (compuestos **13a-c**, respectivamente).

Ejemplos preferidos de grupos F<sup>1</sup> funcionales presentes de forma natural incluyen un grupo tiol y un grupo amino. Ejemplos preferidos de un grupo funcional que se prepara por síntesis química para la incorporación en la glicoproteína incluyen un grupo cetona, un grupo alquino terminal, un grupo azida, un grupo ciclo (hetero)alquino, un grupo ciclopropeno o un grupo tetrazina.

Como se ha descrito anteriormente, los grupos reactivos complementarios Q<sup>1</sup> y los grupos funcionales F<sup>1</sup> son conocidos por los expertos en la técnica, y varias combinaciones adecuadas de Q<sup>1</sup> y F<sup>1</sup> se han descrito anteriormente y se muestran en la Figura 22. Una lista de grupos complementarios Q<sup>1</sup> y F<sup>1</sup> se describe en la Tabla 3.1, páginas 230-232 del capítulo 3 de G.T. Hermanson, "*Bioconjugate Techniques*", Elsevier, 3ª ed. 2013 (ISBN:978-0-12-382239-0).

Una realización del procedimiento de acuerdo con la invención se describe en la Figura 4. La Figura 4 muestra cómo un anticuerpo modificado **13a-c** puede someterse un procedimiento de bioconjugación mediante una adición nucleofílica con maleimida (como para **13a**, lo que conduce al conjugado tioéter **14**) o después de una cicloadición favorecida por la tensión con un reactivo de ciclooctino (como para **13b** o **13c**, que conduce a los triazoles **15** o **16**, respectivamente).

La invención se refiere además a un bioconjugado obtenible mediante el procedimiento de acuerdo con la invención para la preparación de un bioconjugado.

Una ventaja del procedimiento de acuerdo con la invención para la preparación de un bioconjugado, y del enlazador-conjugado y del enlazador de sulfamida de acuerdo con la invención es que la eficacia de la conjugación se incrementa en caso de que se use un enlazador de sulfamida en lugar de un espaciador típico de polietilenglicol (PEG). Por ejemplo, como se demuestra en el ejemplo 58, un experimento de competencia que implica la incubación de trastuzumab que contiene una cisteína única libre modificada por ingeniería genética, con una mezcla estequiométrica de maleimida **17** (que comprende un enlazador comparativo) y **18** (que comprende un enlazador de sulfamida de acuerdo con la invención) mostraba que la eficacia de la conjugación de la maleimida que contenía sulfamida **18** es más alta que con **17**.

La Figura 5 muestra la estructura de los enlazadores-conjugados **17** y **18**, en donde Q<sup>1</sup> es un grupo N-maleimidilo y D es un pireno. El compuesto **18** está de acuerdo con la invención, mientras que el compuesto **17** es un ejemplo comparativo. La Figura 16 muestra la síntesis de **17** y **18**.

5 Asimismo, las conjugaciones de **19-35**, ilustradas en las Figuras 6-9, con trastuzumab-N<sub>3</sub> muestran que un procedimiento de conjugación basado en la cicloadición de azida-ciclooctina es invariablemente más rápido para los enlazadores-conjugados que contienen sulfamida, en comparación con los enlazadores-conjugados tradicionales que contienen PEG, y en la mayoría de los casos es claramente más rápido (véase la Tabla 1 y 2 y las Figuras 12-14).

10 Los conjugados de **20, 21, 23, 26, 29, 33** y **35** con trastuzumab-N<sub>3</sub> están de acuerdo con la invención, y los conjugados de **19, 22, 24, 25, 27, 28, 30, 31, 32** y **34** son ejemplos comparativos. Además, en varios casos, las conjugaciones con estructuras artificiales basadas en PEG, no consiguen una conversión completa, incluso después de tiempos de incubación prolongados, p. ej., Figura 12a, 12b, 13b y 14a.

Tabla 1

Compuesto	Conversión (%)					
	30'	60'	90'	120'	240'	960'
<b>19</b> (comp.)	0	0	n.d.	n.d.	10	n.d.
<b>20</b>	80	90	n.d.	95	>95	n.d.
<b>21</b>	n.d.	60	n.d.	n.d.	90	n.d.
<b>22</b> (comp.)	0	5	n.d.	10	30	n.d.
<b>23</b>	20	30	n.d.	70*	>90*	n.d.
<b>24</b> (comp.)	0	10	20	30	n.d.	80
<b>25</b> (comp.)	20	20	30	60	n.d.	80
<b>26</b>	70	80	85	95	n.d.	100
<b>27</b> (comp.)	20	25	30	30	n.d.	30
<b>28</b> (comp.)	30	40	60	65	n.d.	65
<b>29</b>	60	70	80	85	n.d.	90
<b>30</b> (comp.)	75	>90	n.d.	>95	n.d.	>95
<b>31</b> (comp.)	25	45	n.d.	60	n.d.	95
<b>32</b> (comp.)	20	35	n.d.	70	n.d.	85
<b>33</b>	85	95	n.d.	>95	n.d.	>95
<b>34</b> (comp.)	25	50	n.d.	75	n.d.	95
<b>35</b>	95	>95	n.d.	>95	n.d.	>95

\* Basado en el trastuzumab-N<sub>3</sub> inicial restante

15 n.d.=no determinado

Tabla 2

compuesto	conversión (%)				
	30'	60'	120'	240'	3600'
<b>30</b> (comp.)	25	40	65	95	95
<b>31</b> (comp.)	5	10	15	50	50
<b>32</b> (comp.)	<5	5	10	80	80
<b>33</b>	25	40	65	95	95
<b>34</b> (comp.)	<5	<5	5	85	85
<b>35</b>	80	90	95	>95	>95

- La Figura 12a muestra la eficacia de la conjugación de los derivados de BCN-pireno conjugados a través de un enlazador de sulfamida (compuesto **26**) o enlazadores PEG cortos (compuestos **24** o **25**) con trastuzumab-N<sub>3</sub> (compuesto **13b**).
- 5 La Figura 12b muestra la eficacia de la conjugación de los derivados de DIBAC-pireno conjugados a través de un enlazador de sulfamida (compuesto **29**) o enlazadores PEG cortos (compuestos **27** o **28**) con trastuzumab-N<sub>3</sub> (compuesto **13b**).
- La Figura 13a muestra la eficacia de la conjugación de los derivados de BCN-maitansina conjugados a través de un enlazador de sulfamida (compuesto **33**) o enlazadores PEG cortos (compuestos **30-32**) con trastuzumab-N<sub>3</sub> (compuesto **13b**).
- 10 La Figura 13b muestra la eficacia de la conjugación de los derivados de BCN-maitansina conjugados a través de un enlazador de sulfamida (compuestos **33**) o enlazadores PEG cortos (compuestos **30-32**, en donde el compuesto **30** se solapa con **33**) con trastuzumab-F<sub>2</sub>-GalNAz (compuesto **13c**).
- La Figura 14a muestra la eficacia de la conjugación de los derivados de BCN-duocarmicina conjugados a través de un enlazador de sulfamida (compuesto **35**) o un enlazador PEG corto (compuesto **34**) con trastuzumab-N<sub>3</sub> (compuesto **13b**).
- 15 La Figura 14b muestra la eficacia de la conjugación de los derivados de BCN-duocarmicina conjugados a través de un enlazador de sulfamida (compuesto **35**) o un enlazador PEG corto (compuesto **34**) con trastuzumab-F<sub>2</sub>-GalNAz (compuesto **13c**).
- Una ventaja adicional de un grupo sulfamida, en particular de un grupo acilsulfamida o carbamoilsulfamida, es su polaridad elevada, que imparte un efecto positivo sobre la solubilidad de un enlazador que comprende ese grupo, y sobre la estructura artificial en su conjunto, antes, durante y después de la conjugación. El aumento de la polaridad del espaciador de sulfamida se hace evidente en la Tabla 3 (representada gráficamente en la Figura 11), que resume los tiempos de retención de los compuestos **19-23** y **30-38** en una RP-HPLC. Debido a esa polaridad incrementada, la conjugación con enlazadores-conjugados que contienen el enlazador de sulfamida de acuerdo con la invención, es particularmente adecuada para conjugar compuestos diana hidrófobos con una biomolécula.
- 20 La Figura 11 muestra los tiempos de retención de una HPLC de los compuestos **19-23** y **30-38** con 0,1% de TFA o en tampón a pH 7,4.
- La Figura 6 muestra las estructuras de varios compuestos, en donde un grupo reactivo Q<sup>1</sup> de biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo] (también conocido como grupo BCN) está conectado con bencilamina (D) a través de una unidad enlazadora. Los compuestos **20**, **21** y **23** están de acuerdo con la invención, mientras que los compuestos **19** y **22** son ejemplos comparativos. La Figura 17 muestra la síntesis de **19-22** (véanse también los Ejemplos 21-28) y la Figura 18 la síntesis de **23** (véanse también los Ejemplos 29-31).
- 30 La Figura 7 muestra las estructuras de varios compuestos, en donde un grupo reactivo Q<sup>1</sup> de biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo] (también conocido como un grupo BCN) o un grupo reactivo Q<sup>1</sup> de dibenzoazociclooctina (también conocido como grupo DIBAC o grupo DBCO) está conectado con pireno a través de una unidad enlazadora. Los compuestos **26** y **29** están de acuerdo con la invención, mientras que los compuestos **24**, **25**, **27** y **28** son ejemplos comparativos. La Figura 19 muestra las rutas sintéticas que conducen a los compuestos **24-26**, y la Figura 20 muestra las rutas sintéticas que conducen a los compuestos **27-29**.
- 35 La Figura 8 muestra las estructuras de varios compuestos, en donde un grupo reactivo Q<sup>1</sup> de biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo] (también conocido como grupo BCN) está conectado con maitansina a través de una unidad enlazadora. El compuesto **33** está de acuerdo con la invención, mientras que los compuestos **30**, **31** y **32** son ejemplos comparativos.
- 40 La Figura 9 muestra las estructuras de varios compuestos en donde un grupo reactivo Q<sup>1</sup> de biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo] (también conocido como grupo BCN) está conectado con una estructura artificial de Val-Cit-PABA-duocarmicina a través de una unidad enlazadora. El compuesto **35** está de acuerdo con la invención, mientras que el compuesto **34** es un ejemplo comparativo.
- 45 La Figura 10 muestra las estructuras de los compuestos **36-38** de acuerdo con la invención, en donde un grupo reactivo Q<sup>1</sup> de biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo] (también conocido como grupo BCN) se conjuga con Val-Cit-PABA-Ahx-maitansina a través de un enlazador.
- 50 La síntesis de los compuestos **30-35** se describe en los ejemplos 43-49 y las rutas sintéticas para los compuestos **36-38** se representan gráficamente en la Figura 21 y se describen en los ejemplos 50-55.

## ES 2 740 907 T3

Tabla 3. Tiempos de retención de los compuestos **19-23** y **30-38** medidos por RP-HPLC.

compuesto	tiempo de retención (min)	
	0,1% de TFA	pH 7,4
<b>19</b> (comp.)	11,4	11,4
<b>20</b>	11,6	9,6
<b>21</b>	11,6	9,2
<b>22</b> (comp.)	12,7	12,6
<b>23</b>	10,6	6,9
<b>30</b> (comp.)	10,5	10,6
<b>31</b> (comp.)	10,1	10,1
<b>32</b> (comp.)	9,7	9,7
<b>33</b>	10,4	9,3
<b>34</b> (comp.)	11,5	11,5
<b>35</b>	11,6	10,0
<b>36</b>	10,4	9,3
<b>37</b>	11,2	10,5
<b>38</b>	11,1	9,5

Ya que los compuestos más polares muestran un tiempo de retención reducido, los valores más bajos para los compuestos **20**, **21** y **23** con respecto al compuesto **19** y **22** a pH 7,4 (ningún efecto es visible a un pH bajo), reflejan claramente la polaridad de los espaciadores de sulfamida, en comparación con las estructuras artificiales de enlazadores de amida normales (compuesto **19**). El compuesto **22** metilado, aunque también es una sulfamida en sentido estricto, no muestra la polaridad aumentada, debido a la falta de un protón ácido en el nitrógeno acilado. El hecho de que no sea visible una diferencia clara en el tiempo de retención con 0,1% de TFA (cuyo pH no tendrá lugar una desprotonación) también es una indicación de que el protón ácido desempeña un papel clave en la definición de la polaridad. El compuesto **22** de bisulfamida, destaca finalmente que las unidades de sulfamida adicionales en un solo enlazador (es decir, cuando *f* es 2 o más en los compuestos y el procedimiento de acuerdo con la invención) aumentan aún más la polaridad. La última observación también ha facilitado la conjugación suave de una estructura artificial y BCN que es portadora de dos toxinas lipófilas (maitansinas), como en el compuesto de bisulfamida **38** y **39**, con un azido-mAb.

La polaridad elevada de las sulfamidas también tiene un impacto positivo en el caso de que se impartan restos hidrófobos sobre una biomolécula de interés, que se sabe que requiere grandes cantidades de codisolvente orgánico durante la conjugación y/o que induce la agregación del bioconjugado. Los altos niveles de codisolvente (hasta el 50% de DMA, propilenglicol o DMSO) pueden inducir una desnaturalización de la proteína durante el procedimiento de conjugación y/o pueden requerir un equipamiento especial en el procedimiento de preparación. Un ejemplo de la estabilidad del bioconjugado implica el compuesto **38** altamente polar que contiene bisulfamida, el cual una vez conjugado con trastuzumab, mostraba una agregación de cero a despreciable después de un almacenamiento prolongado, lo que de hecho también se aplica a la monosulfamida **37**.

Debido a esa tendencia reducida a agregarse, el enlazador de sulfamida de acuerdo con la invención es particularmente beneficioso para emplearlo en la preparación de bioconjugados en los que el producto de reacción de la reacción de conjugación, es decir, la reacción entre los grupos reactivos Q<sup>1</sup> y F<sup>1</sup>, proporciona un resto enlazador que es débilmente soluble en agua. En una realización especialmente preferida, la conjugación se realiza a través de una cicloadición, preferiblemente una cicloadición 1,3-dipolar, más preferiblemente una cicloadición de alquino-azida. Como se muestra en los ejemplos, cualquier agregación en esta memoria se reduce de manera beneficiosa utilizando el enlazador de sulfamida de acuerdo con la invención, lo que mejora enormemente la estabilidad del producto al reducir la tendencia a la agregación. Por lo tanto, el problema de la agregación asociada con los restos de enlazadores hidrófobos en los bioconjugados, se resuelve de manera eficiente utilizando el enlazador de sulfamida de acuerdo con la invención, en el espaciador entre la molécula diana y el grupo reactivo Q<sup>1</sup> en el enlazador-conjugado en la formación del bioconjugado.

Una ventaja adicional de un enlazador de sulfamida de acuerdo con la invención, y su uso en procedimientos de bioconjugación, es su facilidad de síntesis y los altos rendimientos. Como se muestra esquemáticamente en la Figura 15, la síntesis de un espaciador de carbamoil sulfamida implica la reacción de un alcohol primario **40** con el reactivo comercialmente disponible CSI (isocianato de clorosulfonilo), lo que conduce a un cloruro de sulfonilo intermedio **41** que, sin tratamiento, reacciona con una amina proporcionando de este modo la carbamoil sulfamida estable **42**. El último compuesto se puede convertir fácilmente en una acilsulfamida en el caso de que R<sup>1</sup> sea un *terc*-butilo, el cual después de un tratamiento con ácido proporciona un producto de sulfamida primaria **43**. Del

mismo modo, en el caso de que  $R^1 =$  bencilo, una desprotección puede verse afectada con la hidrogenación. La sulfamida primaria **43** se puede acilar convenientemente con ésteres activados con procedimientos comunes para proporcionar la acilsulfamida **44**.

5 La facilidad de la síntesis de los enlazadores de sulfamida de acuerdo con la invención, y su excelente rendimiento en los procedimientos de bioconjugación también se hacen evidentes en la síntesis y la utilidad de los compuestos **23** y **38**, ambas estructuras artificiales de bisulfamida que se generan fácilmente mediante la repetición de los eventos resumidos anteriormente, es decir, el tratamiento de un alcohol con CSI, seguido de una reacción con un aminoalcohol, genera a cambio un alcohol que se puede someter nuevamente a la secuencia de eventos, generando de este modo una bisulfamida. Una repetición adicional de la secuencia genera trioligómeros, tetraoligómeros y  
10 oligómeros de sulfamida superiores, dependiendo del número de repeticiones.

El hecho de que el enlazador de sulfamida en el conjugado final sea corto, puede tener una ventaja adicional en el sentido de que se sabe que en los espaciadores particularmente largos de PEG (p. ej., PEG<sub>24</sub>), necesarios para  
15 contrarrestar el carácter hidrófobo de una molécula diana, tal como una citotoxina, pueden tener un impacto negativo sobre la farmacocinética del conjugado de proteína final, como se conoce por los conjugados de anticuerpo-fármaco, en particular con una alta carga de fármaco.

### Ejemplos

#### *Ejemplo 1. Síntesis de 1-fosfato de $\alpha$ -2-azido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-D-galactosa*

El 1-fosfato de  $\alpha$ -2-azido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-D-galactosa se preparó a partir de D-galactosamina de acuerdo con los procedimientos descritos para la D-glucosamina en Linhardt et al., J. Org. Chem. 2012, 77, 1449-1456.

20 <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  (ppm) 5,69 (dd,  $J = 7,2, 3,3$  Hz, 1H), 5,43-5,42 (m, 1H), 5,35 (dd,  $J = 11,1, 3,3$  Hz, 1H), 4,53 (t,  $J = 7,2$  Hz, 1H), 4,21-4,13 (m, 1H), 4,07-4,00 (m, 1H), 3,82 (dt,  $J = 10,8, 2,7$  Hz, 1H), 2,12 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 1,99 (s, 3H). LRMS (ESI-)  $m/z$  calcd. para C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub>P ( $M-H^+$ ) = 410,06; encontrada 410,00.

#### *Ejemplo 2. Síntesis de $\alpha$ -UDP-2-azido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-D-galactosa*

25 El 1-fosfato de  $\alpha$ -2-azido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-D-galactosa, como se había preparado en el ejemplo 1, se fijó a UMP de acuerdo con Baisch et al. Bioorg. Med. Chem., 1997, 5, 383-391.

Por lo tanto, una solución de sal disódica de D-uridina-5'-monofosfato (1,49 g, 4,05 mmol) en H<sub>2</sub>O (15 ml) se trató con DOWEX 50Wx8 (forma H<sup>+</sup>) durante 30 minutos y se filtró. El material filtrado se agitó vigorosamente a temperatura ambiente mientras que se añadía gota a gota tributilamina (0,97 ml, 4,05 mmol). Después de 30 minutos de agitación adicional, la mezcla de reacción se liofilizó y se secó adicionalmente sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a vacío  
30 durante 5 h.

La uridina-5'-monofosfato de tributilamonio resultante se disolvió en DMF seca (25 ml) en atmósfera de argón. Se añadió carbonil diimidazol (1,38 g, 8,51 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente (ta) durante 30 min. A continuación, se añadió MeOH seco (180  $\mu$ l) y se agitó durante 15 minutos para eliminar el exceso de carbonildiimidazol. El MeOH sobrante se eliminó a alto vacío durante 15 min. El compuesto resultante (2,0 g, 4,86  
35 mmol) se disolvió en DMF seca (25 ml) y se añadió gota a gota a la mezcla de reacción. La reacción se dejó agitando a temperatura ambiente durante 2 días antes de una concentración a vacío. El consumo del producto intermedio imidazol-UMP fue controlado por MS. Una cromatografía en columna ultrarrápida en gradiente (7:2:1  $\rightarrow$  5:2:1 de EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O) proporcionó  $\alpha$ -UDP-2-azido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-D-galactosa (1,08 g, 1,51 mmol, 37%).

40 <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) 7,96 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 5,98-5,94 (m, 2H), 5,81-5,79 (m, 1H), 5,70 (dd,  $J = 7,1, 3,3$  Hz, 1H), 5,49 (dd,  $J = 15,2, 2,6$  Hz, 1H), 5,30 (ddd,  $J = 18,5, 11,0, 3,2$  Hz, 2H), 4,57 (q,  $J = 6,0$  Hz, 2H), 4,35-4,16 (m, 9H), 4,07-3,95 (m, 2H), 2,17 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,07 (s, 3H). LRMS (ESI-)  $m/z$  calcd. para C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>19</sub>P<sub>2</sub> ( $M-H^+$ ) = 716,09; encontrada 716,3.

#### *Ejemplo 3. Síntesis de $\alpha$ -UDP-2-azido-2-desoxi-D-galactosa*

45 La desacetilación de  $\alpha$ -UDP-2-azido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-D-galactosa, como se había preparado en el ejemplo 2, se realizó de acuerdo con Kiso et al., Glycoconj. J., 2006, 23, 565.

Por lo tanto,  $\alpha$ -UDP-2-azido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-D-galactosa (222 mg, 0,309 mmol) se disolvió en H<sub>2</sub>O (2,5 mL) y se añadió Et<sub>3</sub>N (2,5 ml) y MeOH (6 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h y luego se concentró al vacío para proporcionar  $\alpha$ -UDP-2-azido-2-desoxi-D-galactosa cruda. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) 7,99 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H), 6,02-5,98 (m, 2H), 5,73 (dd,  $J = 7,4, 3,4$  Hz, 1H), 4,42-4,37 (m, 2H), 4,30-4,18 (m, 4H), 4,14-4,04 (m, 2H), 3,80-3,70 (m, 2H), 3,65-3,58 (m, 1H). LRMS (ESI-)  $m/z$  calcd. para C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>16</sub>P<sub>2</sub> ( $M-H^+$ ) = 590,05; encontrada 590,20.  
50

#### *Ejemplo 4. Síntesis de $\alpha$ -UDP-D-galactosamina (UDP-GalNH<sub>2</sub>)*

A una solución de  $\alpha$ -UDP-2-azido-2-desoxi-D-galactosa, como se había preparado en el ejemplo 3, en una mezcla 1:1 de H<sub>2</sub>O-MeOH (4 ml), se añadió al catalizador de Lindlar (50 mg). La reacción se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante 5 h y se filtró sobre celite. El filtro se enjuagó con H<sub>2</sub>O (10 ml) y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar  $\alpha$ -UDP-D-galactosamina (UDP-GalNH<sub>2</sub>) (169 mg, 0,286 mmol, 92% de rendimiento en dos etapas). <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) 7,93 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 5,99-5,90 (m, 2H), 5,76-5,69 (m, 1H), 4,39-4,34 (m, 2H), 4,31-4,17 (m, 5H), 4,05-4,01 (m, 1H), 3,94-3,86 (m, 1H), 3,82-3,70 (m, 3H), 3,30-3,16 (m, 1H). LRMS (ESI-)  $m/z$  calcd. para C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>16</sub>P<sub>2</sub> (M-H<sup>+</sup>) = 564,06; encontrada 564,10.

#### Ejemplo 5. Síntesis de UDP-GalNProSAC

Se disolvió UDP- $\alpha$ -D-galactosamina (44 mg, 0,078 mmol) en NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M (1 mL). Se añadió éster succinimidílico de ácido 3-AcS-propiónico (38 mg, 0,156 mmol) y DMF (1 ml) y la reacción se agitó durante una noche a ta, seguido de concentración a presión reducida. Una cromatografía ultrarrápida en gradiente (7:2:1  $\rightarrow$  5:2:1 EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O) proporcionó UDP-GalNProSAC (6 mg, 0,009 mmol, 11%) + contaminación de UDP-GalNac. LRMS (ESI-) calcd. para C<sub>20</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>18</sub>P<sub>2</sub>S(M-) 694,08 encontrado 694,1.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O): (ppm) 7,79 (m, 1H), 5,83-5,80 (m, 2H), 5,48-5,45 (m, 1H), 4,28-4,05 (m, 6H), 3,88-3,85 (m, 2H), 3,63-3,55 (m, 3H), 3,17-3,16 (m, 2H), 2,60-2,55 (m, 2H) 2,50 (s, 3H).

#### Ejemplo 6. Síntesis de UDP-GalNProSH (11a)

Se disolvió UDP-GalNProSAC (3 mg, 0,005 mmol) en NaOH 1 M desgasificado (1 ml) y se agitó durante 1,5 h seguido de concentración al vacío. El producto se utilizó crudo en los experimentos de glicosilación.

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) 7,86 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 5,88-5,86 (m, 2H), 5,48-5,45 (m, 1H), 4,20-4,05 (m, 8H), 3,95-3,85 (m, 1H), 3,68-3,65 (m, 2H), 2,69-2,67 (m, 2H), 2,60-2,55 (m, 2H).

#### Ejemplo 7. Síntesis de 2-azido-2,2-difluoroacetato de etilo

A una solución de 2-bromo-2,2-difluoroacetato de etilo (950 mg, 4,68 mmol) en DMSO seco (5 ml) se añadió azida de sodio (365 mg, 5,62 mmol). Después de agitar durante una noche a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió en agua (150 ml). Las capas se separaron, se añadió diclorometano a la capa orgánica y la capa se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Después de la filtración, el disolvente se eliminó a presión reducida (300 mbar) a 35°C proporcionando 2-azido-2,2-difluoroacetato de etilo crudo (250 mg, 1,51 mmol, 32%).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 4,41 (q,  $J = 7,2$  hz, 2H), 1,38 (t,  $J = 6,9$  Hz, 3H).

#### Ejemplo 8. Síntesis de 1-fosfato de $\alpha$ -2-amino-3,4,6-tri-O-acetil-D-galactosa

A una solución de  $\alpha$ -2-azido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-D-galactosa-1-fosfato (105 mg, 0,255 mmol), como se había preparado en el ejemplo 1, en MeOH (3 ml), se añadió Pd/C (20 mg). La reacción se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante 2 h y se filtró sobre celite. El filtro se enjuagó con MeOH (10 ml) y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar la amina libre (94 mg, 0,244 mmol, 96%).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O): (ppm) 5,87-5,76 (m, 1H), 5,44 (br, s, 1H), 5,30-5,20 (m, 1H), 4,55 (t,  $J = 6,3$  Hz, 1H), 4,28-4,00 (m, 3H), 2,11 (s, 3H), 2,03 (s, 3H), 2,00 (s, 3H). LRMS (ESI-)  $m/z$  calcd. para C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>11</sub>P (M-H<sup>+</sup>) = 384,07; encontrada 384,10.

#### Ejemplo 9. Síntesis de 1-fosfato de $\alpha$ -(2'-azido-2,2'-difluoroacetamido)-3,4,6-tri-O-acetil-D-galactosa

A una solución de 1-fosfato de  $\alpha$ -2-amino-3,4,6-tri-O-acetil-D-galactosa (94 mg, 0,244 mmol), como se había preparado en el ejemplo 8, en DMF seca (3 ml), se añadió 2-azido-2,2-difluoroacetato de etilo (48 mg, 0,293 mmol) y Et<sub>3</sub>N (68  $\mu$ L, 0,488 mmol). La reacción se agitó durante 6 h, seguido de concentración al vacío para proporcionar el producto crudo. Una cromatografía en columna ultrarrápida en gradiente (100:0  $\rightarrow$  50:50 de EtOAc:MeOH) proporcionó 1-fosfato de  $\alpha$ -(2'-azido-2',2'-difluoroacetamido)-3,4,6-tri-O-acetil-D-galactosa (63 mg, 0,125 mmol, 51%).

#### Ejemplo 10. Síntesis de UDP- $\alpha$ -(2'-azido-2,2'-difluoroacetamido)-3,4,6-tri-O-acetil-D-galactosa

El 1-fosfato de  $\alpha$ -(2'-azido-2',2'-difluoroacetamido)-3,4,6-tri-O-acetil-D-galactosa como se había preparado en el ejemplo 9, se acopló a UMP de acuerdo con Baisch et al. Bioorg. Medicina. Chem., 1997, 5, 383-391.).

Por lo tanto, una solución de sal disódica de D-uridina-5'-monofosfato (98 mg, 0,266 mmol) en H<sub>2</sub>O (1 ml) se trató con DOWEX 50Wx8 (forma H<sup>+</sup>) durante 40 minutos y se filtró. El material filtrado se agitó vigorosamente a ta mientras se añadía gota a gota tributilamina (63  $\mu$ l, 0,266 mmol). Después de 30 minutos de agitación adicional, la mezcla de reacción se liofilizó y se secó adicionalmente sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> al vacío durante 5 h. El uridin-5'-monofosfato de tributilamonio resultante se disolvió en DMF seca (15 ml) bajo una atmósfera de argón. Se añadió carbonil diimidazol (35 mg, 0,219 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a ta durante 30 min. A continuación, se añadió MeOH seco (4,63  $\mu$ l) y se agitó durante 15 minutos para eliminar el exceso de carbonil diimidazol. El MeOH restante se eliminó a



alto vacío (15 min). Posteriormente, se añadió N-metilimidazol.HCl (61 mg, 0,52 mmol) a la mezcla de reacción y el compuesto resultante (63 mg, 0,125 mmol) se disolvió en DMF seca (15 ml) y se añadió gota a gota a la mezcla de reacción. La reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente antes de concentrar la mezcla a presión reducida. El consumo del producto intermedio imidazol-UMP se controló mediante análisis de MS. Una cromatografía en columna ultrarrápida en gradiente (7:2:1 → 5:2:1 de EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O) proporcionó UDP- $\alpha$ -(2'-azido-2',2'-difluoroacetamido)-3,4,6-tri-O-acetil-D-galactosa.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) 7,87 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 5,913-5,85 (m, 2H), 5,67 (dd,  $J = 6,6, 2,7$  Hz, 1H), 5,56-5,50 (m, 1H), 5,47-5,43 (m, 1H), 5,31-5,25 (m, 2H), 4,61-4,43 (m, 2H), 4,31-4,05 (m, 5H), 2,16 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 1,94 (s, 3H). LRMS (ESI-)  $m/z$  calcd. para C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>F<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>20</sub>P<sub>2</sub> ( $M-H^+$ ) = 809,09; encontrada 809,1.

#### 10 *Ejemplo 11. Síntesis de $\alpha$ -UDP-2-(2'-azido-2',2'-difluoroacetamido)-2-desoxi-D-galactosa (UDP-F2-GalNAz, 11c)*

La desacetilación de UDP- $\alpha$ -(2'-azido-2',2'-difluoroacetamido)-3,4,6-tri-O-acetil-D-galactosa se realizó de acuerdo con Kiso et al., Glycoconj. J., 2006, 23, 565.

Para ello, se disolvió UDP- $\alpha$ -(2'-azido-2',2'-difluoroacetamido)-3,4,6-tri-O-acetil-D-galactosa, como se había preparado en el ejemplo 10, en H<sub>2</sub>O (1 ml) y trietilamina (1 ml) y se añadió MeOH (2,4 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h y luego se concentró al vacío. Una cromatografía en columna ultrarrápida en gradiente (7:2:1 → 5:2:1 de EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O) proporcionó  $\alpha$ -UDP-2-(2'-azido-2',2'-difluoroacetamido)-2-desoxi-D-galactosa (11c).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) 7,86 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 5,91-5,85 (m, 2H), 5,54 (dd,  $J = 6,6, 3,6$  Hz, 1H), 4,31-3,95 (m, 9H), 3,74-3,62 (m, 2H). LRMS (ESI-)  $m/z$  calcd. para C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>F<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>17</sub>P<sub>2</sub> ( $M-H^+$ ) = 683,06; encontrada 683,10.

#### *Recorte de trastuzumab con endoS para preparar 12*

#### 20 *Análisis del espectro de masas de anticuerpos monoclonales*

Se incubó una solución de 50  $\mu$ g (modificada) de IgG, Tris-HCl 1 M, pH 8,0, EDTA 1 mM y DTT 30 mM en un volumen total de aproximadamente 70  $\mu$ L durante 20 minutos a 37°C para reducir los puentes de disulfuro permitiendo analizar tanto la cadena ligera como la pesada. Si estaban presentes, las funcionalidades azidas también se redujeron a aminas en esas condiciones. Las muestras reducidas se lavaron tres veces con milliQ usando una membrana Amicon Ultra-0.5, Ultracel-10 (Millipore) y se concentraron hasta tener IgG 10  $\mu$ M (modificada). La IgG reducida se analizó mediante ionización por electropulverización en tiempo de vuelo (ESI-TOF) en un AccuTOF de JEOL. Los espectros desconvolutados se obtuvieron utilizando el programa informático Magtran.

#### *Ejemplo 12. Preparación de trastuzumab 12 recortado*

El recorte del glicano de trastuzumab se realizó con endoS procedente de *Streptococcus pyogenes* (disponible comercialmente en Genovis, Lund, Suecia). Por lo tanto, trastuzumab (10 mg/ml) se incubó con endoS (40 U/ml) en Tris 25 mM, pH 8,0, durante aproximadamente 16 horas a 37°C. La IgG desglucosilada se concentró y se lavó con MnCl<sub>2</sub> 10 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, utilizando una membrana Amicon Ultra-0.5, Ultracel-10 (Millipore).

Una muestra se sometió a análisis de MS y, después de la desconvolución de los picos, el espectro de masas mostraba un pico de la cadena ligera y dos picos de la cadena pesada. Los dos picos de la cadena pesada pertenecían a un producto principal (49496 Da, 90% de la cadena pesada total), resultante de un trastuzumab sustituido con GlcNAc(Fuc) central, y un producto secundario (49351 Da,  $\pm 10\%$  de la cadena pesada total), resultante de trastuzumab desglucosilado.

#### *Expresión transitoria de un mutante de trastuzumab y enzimas glicosiltransferasas en CHO*

Las proteínas (enzimas y mutante de trastuzumab) se expresaron de forma transitoria en células CHO K1 mediante Evtiria (Zurich, Suiza) a una escala de 20-25 ml.

Mutante doble de GalT (Y289L, C342T) identificado mediante SEQ ID NO: 1

```

RDLRRLPQLVGVHPPLQGSSHGAAIGQPSGELRLRGVAPPPPLQNSSKPRSRA
PSNLDAYSHPGPGPGSNLTSAPVPSTTTTSLTACPEESPLLVGPMLEFNIPVD
LKLVEQQNPKVKLGGRYTPMDCISPHKVAIIIPFRNRQEHLKYWLYLHPILQR
QQLDYGIYVINQAGESMFNRAKLLNVGFKEALKDYDYNCFVFSVDLIPMND
HNTYRCFSQPRHISVAMDKFGFSLPYVQLFGGVSALSQQFLSINGFPNNYWG
WGGEDDDIYNRLAFRGMSVSRPNAVIGKTRMIRHSRDKKNEPNPQRFDRIAHT
KETMLSDGLNSLTYMVLEVQRYPLYTKITVDIGTPS

```

CeGalNAct [30-383] identificado mediante SEQ ID NO: 2

KIPSLYENLTIGSSTLIADVDAMEAVLGNTASTSDDLDTWNSTFSPISEVNQTS  
 FMEDIRPILFPDNQTLQFCNQTPPHLVGPIRVFLDEPDFKTLEKIYPDTHAGGHG  
 MPKDCVARHRVAIIVPYRDREAHLRIMLHNLHSLAKQQLDYAIFIVEQVANQ  
 TFNRGKLMNVGYDVASRLYPWQCFIFHDVDLLPEDDRNLYTCPIQPRHMSVAI  
 DKFNYKLPYSAIFGGISALTKDHLK KINGFSNDFWGWGGEDDDLATRTSMAGL  
 KVSRYPTQIARYKMIKHSTEATNPVNKCRYKIMGQTKRRWTRDGLSNLKYKL  
 VNLELKPLYTRAVVDLLEKDCRRELRRDFPTCF

CeGalNAct(30-383)-His<sub>6</sub> identificado mediante SEQ ID NO: 3

KIPSLYENLTIGSSTLIADVDAMEAVLGNTASTSDDLDTWNSTFSPISEVNQTS  
 FMEDIRPILFPDNQTLQFCNQTPPHLVGPIRVFLDEPDFKTLEKIYPDTHAGGHG  
 MPKDCVARHRVAIIVPYRDREAHLRIMLHNLHSLAKQQLDYAIFIVEQVANQ  
 TFNRGKLMNVGYDVASRLYPWQCFIFHDVDLLPEDDRNLYTCPIQPRHMSVAI  
 DKFNYKLPYSAIFGGISALTKDHLK KINGFSNDFWGWGGEDDDLATRTSMAGL  
 KVSRYPTQIARYKMIKHSTEATNPVNKCRYKIMGQTKRRWTRDGLSNLKYKL  
 VNLELKPLYTRAVVDLLEKDCRRELRRDFPTCFHHHHHH

5 Trastuzumab (cadena pesada N300C), identificado mediante SEQ ID NO: 4

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP  
 TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY  
 AMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT  
 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT  
 KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV  
 VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVS SVLTVLHQDWL  
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL  
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Trastuzumab (cadena ligera), identificado mediante SEQ ID NO: 5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFL  
 YSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

*Ejemplo 13-1. Purificación de CeGalNAct*

10 El protocolo de purificación se basa en el intercambio de cationes en una columna SP (GE Healthcare) seguido de una cromatografía de exclusión por tamaño.

15 En un experimento de purificación típico, el material sobrenadante producido por CHO que contenía el CeGalNAct expresado, se dializó frente a tampón Tris 20 mM, pH 7,5. El material sobrenadante (normalmente 25 ml) se filtró a través de un filtro con diámetro de poro de 0,45 µm y posteriormente se purificó sobre una columna de intercambio catiónico (columna SP, 5 ml, GE Healthcare), que se equilibró con tampón Tris 20 mM, pH 7,5 antes del uso. La purificación se realizó en un sistema de cromatografía AKTA Prime equipado con un recolector de fracciones externo. Las muestras se cargaron desde la bomba A del sistema. Las proteínas no unidas se eluyeron de la columna lavando la columna con 10 volúmenes de columna (VCs) de tampón Tris 20 mM, pH 7,5. La proteína retenida se eluyó con tampón de elución (Tris 20 mM, 1 NaCl, pH 7,5; 10 ml). Las fracciones recogidas se analizaron

mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida (12%) y las fracciones que contenían la proteína diana se combinaron y se concentraron usando filtración por centrifugación hasta un volumen de 0,5 ml. A continuación, la proteína se purificó en una columna preparativa de exclusión por tamaño Superdex, sobre un sistema purificador AKTA (UNICORN v6.3). Esta etapa de purificación condujo a la identificación y la separación de un dímero y una fracción de monómero de proteína diana. Ambas fracciones se analizaron por SDS-PAGE y se almacenaron a -80°C antes de un uso posterior

*Ejemplo 13-2. Purificación de CeGalNAcT-His<sub>6</sub>*

En un experimento de purificación típico, el material sobrenadante de CHO se filtró a través de un filtro con un diámetro de poro de 0,45 µm y se aplicó a una columna de Ni-NTA (GE Healthcare, 5 ml), que se había equilibrado con tampón A (tampón Tris 20 mM, imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5) antes del uso. Antes de la filtración, se añadió imidazol al material sobrenadante de CHO hasta una concentración final de 20 mM para minimizar la unión no específica a la columna. La columna se lavó primero con tampón A (50 ml). La proteína retenida se eluyó con tampón B (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 250 mM, pH 7,5, 10 ml). Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida (12%), y las fracciones que contenían la proteína diana purificada se combinaron y el tampón se intercambió por Tris 20 mM (pH 7,5) mediante diálisis realizada durante una noche a 4°C. La proteína purificada se almacenó a -80°C antes de un uso posterior. Nota: para la identificación de las especies de CeGalNAcT-His<sub>6</sub> monoméricas y dimericas se realizó una purificación mediante SEC adicional (como se ha descrito anteriormente).

*Transferencia de 11a-c a 12 para preparar 13a-c*

*Ejemplo 14. Preparación de trastuzumab(GalNProSH)<sub>2</sub> 13a*

El trastuzumab desglucosilado (10 mg/ml) se incubó con un derivado de galactosa UDP **11a** (1,3 mM) y β(1,4)-Gal-T1(Y289L,C342T) (2 mg/mL) en MnCl<sub>2</sub> 10 mM y Tris-HCl 50 mM, pH 6,0 durante 16 horas a 30°C.

A continuación, el trastuzumab funcionalizado se incubó con agarosa y proteína A (40 µl por mg de IgG) durante 1 hora a ta. La agarosa y proteína A se lavó tres veces con TBS (pH 6,0) y la IgG se eluyó con glicina-HCl 100 mM pH 2,5. La IgG eluida se neutralizó con Tris-HCl 1 M a pH 7,0 y se concentró y se lavó con Tris-HCl 50 mM a pH 6,0 usando una membrana Amicon Ultra-0.5, Ultracel-10 (Millipore) a una concentración de 15-20 mg/ml. Un análisis espectral después de la digestión con Fabricator y el lavado posterior con MilliQ usando una membrana Amicon Ultra-0.5, Ultracel-10 (Millipore) mostraba la formación de dos productos, el producto principal (24387 Da) con el GalNProSH introducido y el secundario (25037 Da) con el GalNProSH introducido + UDPGalNProSH como disulfuro. La relación entre los productos es de aproximadamente 60:40.

*Glicosiltransferencia de un derivado de UDP-galactosa con Gal-T1(Y289L,C342T), protocolo general*

La introducción enzimática de un derivado de UDP-galactosa sobre trastuzumab desglucosilado se efectuó con el mutante doble de β(1,4)-galactosiltransferasa bovina [β(1,4)-Gal-T1(Y289L,C342T)]. El trastuzumab desglucosilado (10 mg/ml) se incubó con el derivado de UDP-galactosa apropiado (0,4 mM) y el mutante doble de Gal-T (1 mg/ml) en MnCl<sub>2</sub> 10 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, durante 16 horas a 30°C.

A continuación, el trastuzumab funcionalizado se incubó con agarosa y proteína A (40 µl por mg de IgG) durante 2 horas a 4°C. La agarosa y proteína A se lavó tres veces con PBS y la IgG se eluyó con glicina 100 mM-HCl pH 2,7. La IgG eluida se neutralizó con Tris-HCl 1 M, pH 8,0, y se concentró y se lavó con PBS utilizando una membrana Amicon Ultra-0.5, Ultracel-10 (Millipore) hasta una concentración de 15-20 mg/ml.

*Glicosiltransferencia de derivados de UDP-GalNAc con CeGalNAcT (protocolo general)*

La introducción enzimática de derivados de GalNAc sobre IgG se efectuó con una CeGalNAc-transferasa. La IgG desglucosilada (preparada como se ha descrito anteriormente, 10 mg/ml) se incubó con un derivado de UDP-GalNAc modificado (por ejemplo, un derivado de azido-azúcar modificado-UDP) (0,4 mM) y CeGalNAc-T (1 mg/ml) en MnCl<sub>2</sub> 10 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, durante 16 horas a 30°C. La IgG funcionalizada (por ejemplo, IgG funcionalizada con azido) se incubó con agarosa y proteína A (40 µl por mg de IgG) durante 2 horas a 4°C. La agarosa y proteína A se lavó tres veces con PBS y la IgG se eluyó con glicina 100 mM-HCl pH 2,7. La IgG eluida se neutralizó con Tris-HCl 1 M, pH 8,0, y se concentró y se lavó con PBS utilizando una membrana Amicon Ultra-0.5, Ultracel-10 (Millipore) hasta una concentración de 15-20 mg/ml.

*Ejemplo 15. Preparación de trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub> 13b con el mutante doble de GalT*

Trastuzumab se sometió al protocolo de una transferencia de glicosilo con UDP-N-azidoacetilgalactosamina (UDP-GalNAz) y el mutante doble de Gal-T. Después de una purificación por afinidad con proteína A, el análisis de masas indicaba la formación de un producto principal (49713 Da, 90% de la cadena pesada total), resultante de la transferencia de GalNAz al trastuzumab central sustituido con GlcNAc(Fuc), y un producto secundario (49566 Da, ± 10% de la cadena pesada total), resultante de la transferencia de GalNAz a un trastuzumab central sustituido con GlcNAc.

Este es un ejemplo de una glicoproteína modificada con azido de acuerdo con la fórmula (**13b**).

*Ejemplo 16-1. Preparación de trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub> 13b con CeGalNAc-T*

5 El trastuzumab recortado se sometió al protocolo de transferencia de glicosilo con UDP-N-azidoacetilgalactosamina (UDP-GalNAz) y CeGalNAc-T. Después de la purificación por afinidad con proteína A, una pequeña muestra se redujo con DTT y posteriormente se sometió a un análisis MS que indica la formación de un producto principal (49713 Da, 90% de la cadena pesada total), resultante de la transferencia de GalNAz al trastuzumab central sustituido con GlcNAc(Fuc), y un producto secundario (49566 Da, ± 10% de la cadena pesada total), resultante de la transferencia de GalNAz al trastuzumab central sustituido con GlcNAc.

*Ejemplo 16-2. Preparación de trastuzumab(F<sub>2</sub>-GalNAz)<sub>2</sub> 13c con CeGalNAc-T*

10 El trastuzumab recortado se sometió al protocolo de transferencia de glicosilo con UDP-N-azidodifluoroacetilgalactosamina (UDP-F<sub>2</sub>-GalNAz, **13c**) y CeGalNAcT o CeGalNAcT-His<sub>6</sub>. Después de una purificación por afinidad con proteína A, una pequeña muestra se redujo con DTT y posteriormente se sometió a un análisis MS que indicaba la formación de un producto principal de cadena pesada (49865 Da, aproximadamente el 90% del total de la cadena pesada), resultante de la transferencia de F<sub>2</sub>-GalNAz a un trastuzumab central sustituido con GlcNAc(Fuc) que había reaccionado con DTT durante la preparación de la muestra.

Este es un ejemplo de una glicoproteína modificada con azido de acuerdo con la fórmula (**13c**).

Síntesis de **17-68**

*Ejemplo 17. Síntesis de éster de OSu de ácido 1-pirenocarboxílico (45)*

20 A una solución de ácido 1-pirenocarboxílico (65 mg, 0,24 mmol) en DCM/DMF (2 ml de cada uno) se añadió N-hidroxisuccinimida (34 mg, 0,29 mmol) y EDC.HCl (70 mg, 0,36 mmol). La reacción se agitó durante 2 h y luego se diluyó con DCM (10 ml), se lavó con ácido cítrico acuoso (10%, 5 ml) y se saturó con NaHCO<sub>3</sub> (3 x 5 mL), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar **45** crudo.

*Ejemplo 18. Síntesis de (46)*

25 El compuesto **45** (480 mg, 1,38 mmol) se disolvió en DCM (15 ml) y se añadió (2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamato de *tert*-butilo (348 mg, 1,4 mmol) y Et<sub>3</sub>N (286 µL, 2,1 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante una noche y se inactivó con agua (15 ml), la capa orgánica se lavó con agua (1 x 15 ml) y NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (2 x 15 mL), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró al vacío. Una purificación por cromatografía en columna ultrarrápida en gradiente (DCM → DCM:MeOH 95:5) proporcionó el producto **46** (460 mg, 0,97 mmol, 70%).

30 *Ejemplo 19. Síntesis de (17)*

Amina de pireno protegida con Boc **46** (460 mg, 0,97 mmol) se disolvió en metanol (10 ml) y se añadió cloruro de acetilo (140 µl, 1,9 mmol) y, después de 1 y 3 horas, se añadió cloruro de acetilo adicional (2 x 140 µL, 1,9 mmol). Después de agitar durante 4 h, la mezcla se concentró a presión reducida. A continuación, el producto crudo (100 mg, 0,24 mmol) se disolvió en DCM (3 ml) y se añadió 4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)butanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (50 mg, 0,17 mmol) y Et<sub>3</sub>N (73 µL, 0,52 mmol). Después de agitar durante una noche, la solución se inactivó con agua (3 ml), se lavó con agua (2 x 3 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró. La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida en gradiente (DCM → DCM:MeOH 95:5) proporcionó el producto **17** (69 mg, 0,13 mmol, 75%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8,48 (d, 1H, J = 9,2 Hz), 8,12 (d, 2H, J = 7,6 Hz), 8,04-7,93 (m, 6H), 6,59 (bs, 1H), 6,38 (s, 2H), 5,99 (bs, 1H), 3,76-3,71 (m, 4H), 3,62-3,60 (m, 2H), 3,54-3,52 (m, 2H), 3,37 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 3,23-3,17 (m, 4H), 1,82 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 1,63 (q, J = 7,2 Hz, 2H).

*Ejemplo 20-1. Síntesis del derivado de alcohol de maleimida (47)*

45 A una solución enfriada (0°C) de 5-aminopentan-1-ol (100 mg, 0,97 µmol) en NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (16 mL) se añadió N-metoxicarbonilmaleimida (150 mg, 0,64 µmol). La mezcla se agitó durante 1,5 h y se extrajo con DCM (2 x 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentraron. El producto **47** se obtuvo como un aceite incoloro (137 mg, 0,75 mmol, 75%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 6,69 (s, 2H), 3,70-3,67 (m, 1H), 3,67-3,60 (m, 2H), 3,53 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 1,68-1,54 (m, 4H), 1,42-1,31 (m, 2H).

*Ejemplo 20-2. Síntesis del derivado de maleimida-pireno (18)*

50 A una solución del alcohol **47** (7,7 mg, 42 µmol) en DCM (1 ml) se añadió isocianato de clorosulfonilo (CSI, 3,9 µl, 5,9 mg, 42 µmol). Después de agitar la solución durante 15 min, se añadió Et<sub>3</sub>N (18 µL, 13 mg, 126 µmol) y una solución de 1-pirenometilamina.HCl (**49**, 11 mg, 42 µmol) y Et<sub>3</sub>N (18 µL, 13 mg, 126 µmol). Después de 80 min, se añadió NH<sub>4</sub>Cl acuoso saturado (20 ml) y DCM (20 ml). Después de la separación, la fase orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. Después de una cromatografía en columna ultrarrápida en gradiente (DCM → MeOH al 2% en DCM), el producto **18** se obtuvo como un sólido ligeramente amarillo (7,4 mg, 14,2 µmol, 34%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz,

$\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$   $\delta$  (ppm) 8,32-8,26 (m, 1H), 8,20-7,90 (m, 8H), 6,61 (s, 2H), 4,90 (s, 2H), 3,65 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H), 3,30 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 1,40-1,20 (m, 4H), 1,08-0,97 (m, 2H).

**Ejemplo 21. Síntesis de ácido BCN-heptanoico (52)**

5 A una solución de un derivado de BCN-OSu **51** en MeCN (5 ml) se añadió ácido 7-aminoheptanoico **50** (145 mg, 1,0 mmol) en  $\text{NaHCO}_3$  acuoso 0,1 M (30 mL) y MeCN (25 mL). La mezcla se agitó durante 4 h y se concentró parcialmente. Se añadió  $\text{NH}_4\text{Cl}$  acuoso saturado (30 ml) y, después de la extracción con DCM (2 x 30 ml), los extractos orgánicos combinados se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentraron. El producto **52** se utilizó en la etapa sin una purificación adicional.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 4,68 (bs, 1H), 4,14 (d,  $J = 7,9$  Hz, 2H), 3,17 (dd,  $J = 12,8, 6,3$  Hz, 2H), 2,35 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 2,32-2,09 (m, 6H), 1,70-1,25 (m, 11H), 0,94 (t,  $J = 9,7$  Hz, 2H).

10 **Ejemplo 22. Síntesis de bencilamida de ácido BCN-heptanoico (19)**

A una mezcla de **51** (291 mg, 1,00 mmol) en DCM (25 ml) se añadió ácido 7-aminoheptanoico **50** y  $\text{Et}_3\text{N}$  (417  $\mu\text{l}$ , 303 mg, 3,00 mmol) y DMF (10 ml). Después de la evaporación (40°C) de DCM, la mezcla resultante se agitó durante 10 min y se añadió una solución acuosa (0,1 M) de  $\text{NaHCO}_3$ . Después de agitar la mezcla de reacción durante 3 h adicionales, se vertió en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  acuoso saturado (50 ml) y se extrajo con DCM (2 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentraron. El residuo se recogió en DCM (25 ml), se añadió clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDCI.HCl, 249 mg, 1,30 mmol) y se añadió *N*-hidroxisuccinimida (150, 1,30 mmol) y la mezcla resultante se agitó durante 18 h. Después de la adición de agua (50 ml), las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con DCM (2 x 25 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentraron. Una cromatografía en columna proporcionó el derivado de éster NHS intermedio de **52** como un aceite espeso incoloro (233 mg, 0,56 mmol, 56%).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 4,69 (s, 1H), 4,14 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H), 3,17 (dd,  $J = 13,6, 6,9$  Hz, 2H), 2,91-2,77 (m, 4H), 2,61 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 2,37-2,12 (m, 6H), 1,83-1,69 (m, 2H), 1,66-1,17 (m, 9H), 1,01-0,90 (m, 2H). A continuación, a una solución del éster NHS de ácido BCN-aminoheptanoico intermedio (49 mg, 0,12 mmol) en DCM (12 ml) se añadió bencilamina (19  $\mu\text{L}$ , 19 mg, 0,18 mmol) y  $\text{Et}_3\text{N}$  (50  $\mu\text{l}$ , 36 mg, 0,36 mmol). La mezcla se agitó durante 19 h y se añadió DCM (10 ml) y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  saturado acuoso (20 ml). La capa orgánica se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentró. Después de la cromatografía en columna en gradiente (25%  $\rightarrow$  50% de EtOAc en heptano) se obtuvo el compuesto **19** como un sólido blanco (31 mg, 0,076 mmol, 63%).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7,38-7,27 (m, 5H), 5,72 (bs, 1H), 4,64 (bs, 1H), 4,45 (d,  $J = 5,6$  Hz, 2H), 4,13 (d,  $J = 8,1$  Hz, 2H), 3,16 (dd,  $J = 12,8, 6,3$  Hz, 2H), 2,38-2,13 (m, 8H), 1,75-1,11 (m, 11H), 1,00-0,88 (m, 2H).

30 **Ejemplo 23. Síntesis de *N*-bencilsulfamoilcarbamato de *terc*-butilo (53)**

Bajo una atmósfera de  $\text{N}_2$ , a una solución enfriada (-78°C) de *terc*-butanol en  $\text{Et}_2\text{O}$  (20 ml) se añadió isocianato de clorosulfonilo (CSI) y se dejó que la mezcla alcanzara la ta. Después de 45 minutos, la mezcla se concentró y el clorosulfonilcarbamato de *terc*-butilo resultante se utilizó en la siguiente etapa sin una purificación adicional (considerado puro en un 68%). Por tanto, a una solución del clorosulfonilcarbamato de *terc*-butilo crudo (199 mg de crudo = 135 mg, 0,63 mmol) en DCM (10 ml) se añadió  $\text{Et}_3\text{N}$  (263  $\mu\text{L}$ , 191 mg, 1,89 mmol) y bencilamina (82  $\mu\text{L}$ , 81 mg, 0,85 mmol). La mezcla se agitó durante 2 h y se inactivó con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  acuoso saturado. Se añadió DCM (10 ml) y se separaron las capas. La capa orgánica se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentró. Después de la cromatografía en columna en gradiente (25%  $\rightarrow$  50% de EtOAc en heptano), se obtuvo el compuesto **53** como un sólido blanco (169 mg, 0,59 mmol).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7,41-7,29 (m, 5H), 5,41-5,30 (m, 1H), 4,30-4,20 (m, 2H), 1,46 (s, 9H).

**Ejemplo 24. Síntesis de *N*-bencilsulfamida (54)**

A una solución de *N*-bencilsulfamoilcarbamato de *terc*-butilo **53** (108 mg, 0,38) en DCM (10 ml) se añadió ácido trifluoroacético (2 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 1,5 h y se vertió en  $\text{NaHCO}_3$  acuoso saturado (50 mL). Después de la adición de otros 50 ml de  $\text{NaHCO}_3$  acuoso saturado, la mezcla acuosa se extrajo con DCM (50 ml). La capa orgánica se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentró. El producto **54** se obtuvo como un sólido blanco (36 mg, 0,19 mmol, 50%).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7,41-7,30 (m, 5H), 4,32 (d,  $J = 6,1$  Hz, 2H).

**Ejemplo 25. Síntesis de (20)**

A una solución de **52** (44 mg, 0,136 mmol) en DCM (5 ml) se añadió EDCI.HCl (39 mg, 0,204 mmol), DMAP (2,9 mg, 0,024 mmol) y *N*-bencilsulfamida **54** (13 mg, 0,068 mmol). Después de dejar agitar la mezcla de reacción durante 22 h a ta, se añadió EtOAc (20 ml) y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  saturado acuoso (20 ml). Después de la separación, la fase acuosa se extrajo con EtOAc (20 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentraron. Después de la cromatografía en columna en gradiente (25%  $\rightarrow$  50% de EtOAc en heptano), el producto **20** se obtuvo como una mezcla inseparable del compuesto del título y *N*-bencilsulfamida **54** (relación en masa de 3,2/1) (14,4 mg).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7,38-7,27 (m, 5H), 5,99 (bs, 1H), 5,01 (t,  $J = 6,2$  Hz, 1H), 4,20 (s, 2H), 4,85-4,70 (m, 2H), 4,13 (d,  $J = 8,12$  Hz, 2H), 3,15 (q,  $J = 6,50$ , 2H), 2,35-2,15 (m, 6H), 2,09 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 1,65-0,75 (m, 13H).

**Ejemplo 26. Síntesis de (56)**

A una solución de **51** (430 mg, 1,48 mmol) en DCM (20 ml) se añadió una solución de 5-aminopentan-1-ol **55** (152 mg, 1,47 mmol) en DCM (4 ml) y Et<sub>3</sub>N (619 µL, 449 mg, 4,44 mmol). La mezcla se agitó durante 1,5 h a ta, después de lo cual se añadió una solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (40 ml). Después de la separación, la capa orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna en gradiente (EtOAc/heptano 1/1 → 3/1). El producto **56** se obtuvo como un líquido pegajoso incoloro (356 mg, 1,27 mmol, 81%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 4,68 (s, 1H), 4,14 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 3,65 (dd, *J* = 11,7, 6,3 Hz, 2H), 3,19 (dd, *J* = 13,2, 6,7 Hz, 2H), 2,35-2,15 (m, 6H), 1,66-1,30 (m, 7H), 1,02-0,88 (m, 2H).

#### Ejemplo 27. Síntesis de (21)

A una solución de **56** (51 mg, 0,18 mmol) en DCM (10 ml) se añadió isocianato de clorosulfonilo (16 µL, 25 mg, 0,18 mmol). Después de agitar la mezcla durante 40 min, se añadió Et<sub>3</sub>N (75 µL, 55 mg, 0,54 mmol) y bencilamina (19 µL, 19 mg, 0,18 mmol). La mezcla se agitó durante 1,5 h más y se detuvo mediante la adición de una solución acuosa de NH<sub>4</sub>Cl (sat). Después de la separación, la capa acuosa se extrajo con DCM (20 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en columna en gradiente (20% → 50% de EtOAc en pentano) y el producto **21** se obtuvo como un aceite espeso incoloro (57 mg, 0,12 mmol, 67%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7,41-7,28 (m, 5H), 5,55 (s, 1H), 4,75 (s, 1H), 4,29-4,24 (m, 2H), 4,20-4,08 (m, 2H), 3,19 (dd, *J* = 13,4, 6,6 Hz, 2H), 2,37-2,16 (m, 6H), 1,74-1,31 (m, 9H), 0,94 (t, *J* = 9,7 Hz, 2H).

#### Ejemplo 28. Síntesis de (22)

Bajo una atmósfera inerte, **21** (93 mg, 0,19 mmol) se disolvió en THF anhidro (10 ml). Se añadió PPh<sub>3</sub> (49 mg, 0,19 mmol) y MeOH (50 µL, 1,23 mmol) y la mezcla se enfrió a 0°C. Se añadió lentamente una solución de DIAD (37 µL, 0,19 mmol) en THF anhidro (5 ml) y se dejó que la mezcla alcanzara la ta, después de lo cual la reacción se agitó durante 18 h y luego se concentró. Una cromatografía en columna en gradiente (20 → 50% de EtOAc en heptano) proporcionó el producto **22** como un aceite espeso incoloro. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7,39-7,26 (m, 5H), 5,94-5,84 (m, 1H), 4,80-4,64 (m, 1H), 4,19 (d, *J* = 6,4 Hz, 2H), 4,13 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H), 4,08 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 3,17 (q, 2H, *J* = 6,5 Hz), 3,12 (s, 3H), 2,35-2,14 (m, 6H), 1,80-1,65 (m, 13H).

#### Ejemplo 29. Síntesis de (58)

A una solución de **57** (1,5 g, 10 mmol) en DCM (150 ml), bajo una atmósfera de N<sub>2</sub>, se añadió CSI (0,87 ml, 1,4 g, 10 mmol), Et<sub>3</sub>N (2,8 ml, 2,0 g, 20 mmol) y 2-(2-aminoetoxi)etanol (1,2 ml, 1,26 g, 12 mmol). La mezcla se agitó durante 10 minutos y se inactivó mediante la adición de NH<sub>4</sub>Cl acuoso (sat., 150 ml). Después de la separación, las capas acuosas se extrajeron con DCM (150 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentraron. El residuo se purificó con cromatografía en columna. El producto **58** se obtuvo como un aceite espeso ligeramente amarillo (2,06 g, 5,72 mmol, 57%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 6,0 (bs, 1H), 4,28 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 3,78-3,73 (m, 2H), 3,66-3,61 (m, 2H), 3,61-3,55 (m, 2H), 3,34 (t, *J* = 4,9 Hz, 2H), 2,37-2,15 (m, 6H), 1,64-1,48 (m, 2H), 1,40 (quinteto, *J* = 8,7 Hz, 1H), 1,05-0,92 (m, 2H).

#### Ejemplo 30. Síntesis de (59)

A una solución de **58** (130 mg, 0,36 mmol) se añadió posteriormente CSI (31 µL, 51 mg, 0,36 mmol), Et<sub>3</sub>N (151 µL) y 2-(2-aminoetoxi)etanol (36 µL, 38 mg, 0,36 mmol). Después de 15 minutos, se añadió agua (20 ml) y, después de la separación, la capa acuosa se acidificó con HCl ac. 1 M a pH 3 y se extrajo con DCM (20 ml). La capa de DCM se secó y se concentró. Después de una cromatografía en columna, se obtuvo el producto **59** como un aceite incoloro (87 mg, 0,15 mmol, 42%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 6,15-5,95 (m, 2H), 4,40-4,32 (m, 2H), 4,31 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 3,85-3,55 (m, 10H), 3,45-3,25 (m, 4H), 2,40-2,15 (m, 6H), 1,65-1,47 (m, 2H), 1,40 (quinteto, *J* = 8,7 Hz, 1H), 1,06-1,92 (m, 2H).

#### Ejemplo 31. Síntesis de (23)

A una solución de **59** (63 mg, 0,11 mmol) en DCM (10 ml) se añadió posteriormente cloroformiato de *p*-nitrofenilo (22 mg, 0,11 mmol) y Et<sub>3</sub>N (46 µL, 33 mg, 0,33 mmol). Después de 20 h, se añadió bencilamina (22 µL, 21,6 mg, 0,20 mmol) a la mezcla de reacción. La mezcla se agitó durante 24 h adicionales, en donde después la mezcla se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gradiente (1<sup>a</sup> col. 0 → 20% de MeOH en DCM, 2<sup>a</sup> col. 0 → 8% de MeOH en DCM). El producto **23** se obtuvo como una película incolora (18 mg, 0,026 mmol, 23%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) (ppm) 7,38-7,18 (m, 5H), 4,31-4,22 (m, 6H), 4,22-4,16 (m, 2H), 3,70-3,63 (m, 4H), 3,63-3,54 (m, 4H), 3,34 (s, 1H), 3,24-3,15 (m, 4H), 2,30-2,10 (m, 6H), 1,68-1,52 (m, 2H), 1,42 (quinteto, *J* = 8,7 Hz, 1H), 1,02-0,90 (m, 2H).

#### Ejemplo 32. Síntesis de BCN-dPEG<sub>4</sub>-C(O)OSu (60a)

A una solución de ácido amino-dPEG<sub>4</sub> (1,23 g, 4,23 mmol) en DMF anhidra (30 ml) se añadió posteriormente **51** (1,02 g, 3,85 mmol) y trietilamina (1,60 ml, 11,53 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente, después de lo cual se añadió EDCl.HCl (0,884 g, 4,61 mmol) y NHS (88 mg, 0,77 mmol). La solución resultante se agitó durante una noche a ta y se vertió en 100 ml de NaHCO<sub>3</sub> (sat.) y 150 ml de EtOAc. Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> sat. (90 mL) y H<sub>2</sub>O (75 ml). La fase orgánica se secó

(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró al vacío. Una cromatografía ultrarrápida en gradiente (MeCN → MeCN:H<sub>2</sub>O 30:1) proporcionó el producto **60a** como un aceite incoloro (800 mg, 1,48 mmol, 40%).

*Ejemplo 33. Síntesis de BCN-dPEG<sub>4</sub>-pireno (24)*

5 A una solución de **60a** (50 mg, 0,095 mmol) en DCM (10 ml) se añadió **49** (30 mg, 0,11 mmol) y Et<sub>3</sub>N (17 µL, 0,12 mmol). Después de agitar durante una noche a ta, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. La purificación posterior por cromatografía en columna ultrarrápida (DCM → DCM:MeOH 9:1) proporcionó el producto **24** (38 mg, 61%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8,29-8,26 (m, 2H), 8,19-8,11 (m, 4H), 8,06-7,97 (m, 4H), 7,04 (br. s, 1H), 5,24 (br. s, 1H), 5,16 (d, 2H, J = 4 Hz), 4,06 (d, 2H, J = 4 Hz), 3,76 (t, 2H, J = 5,6 Hz), 3,50 (m, 2H), 3,39-3,22 (m, 14H), 2,56-2,53 (m, 2H), 2,27-2,13 (m, 7H), 1,29-1,25 (m, 2H), 0,87-0,83 (m, 2H).

10 *Ejemplo 34. Síntesis de BCN-PEG<sub>8</sub>-C(O)OSu (60b)*

A una solución de ácido amino-dPEG<sub>8</sub> (217 mg, 0,492 mmol) en DMF anhidra (3 ml) se añadió posteriormente **51** (143 mg, 0,492 mmol) y Et<sub>3</sub>N (204 µL, 1,47 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a ta, después de lo cual se añadió EDCI.HCl (0,88 g, 4,61 mmol) y NHS (88 mg, 0,77 mmol). La solución resultante se agitó durante una noche a ta y se vertió en 50 ml de NaHCO<sub>3</sub> (sat.) y 50 ml de EtOAc. Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> sat. (50 mL) y H<sub>2</sub>O (30 ml). La fase orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró al vacío. Una cromatografía ultrarrápida en gradiente (MeCN → MeCN:H<sub>2</sub>O 30:1) proporcionó el producto **60b** como un aceite incoloro (212 mg, 0,30 mmol, 60%).

15 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 4,13 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 3,84 (t, J = 6,3 Hz, 2H), 3,68-3,59 (m, 28 H), 3,54 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 3,36 (q, J = 5,4 Hz, 2H), 2,89 (t, J = 6,3 Hz, 2H), 2,82 (s, 4H), 2,35-2,15 (m, 6H), 1,68-1,48 (m, 2H), 1,44-1,23 (m, 1H), 1,00-0,86 (m, 2H). LRMS (ESI+) m/z calcd. para C<sub>34</sub>H<sub>54</sub>N<sub>2</sub>O<sub>14</sub> (M+Na<sup>+</sup>) = 737,8; encontrada 737,3.

*Ejemplo 35. Síntesis de BCN-PEG<sub>8</sub>-pireno (25)*

A una solución de **60b** (100 mg, 0,14 mmol) en DCM (15 ml) se añadió 1-aminometilpireno.HCl **49** (50 mg, 0,19 mmol) y Et<sub>3</sub>N (47 µL, 0,25 mmol). Después de agitar durante 3 h, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. Una purificación posterior por cromatografía ultrarrápida en columna (DCM → DCM:MeOH 95:5) proporcionó el producto **25** (35 mg, 30%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8,30-8,28 (m, 1H), 8,21-8,13 (m, 4H), 8,05-7,99 (m, 4H), 7,22 (bs, 1H), 5,16 (d, 2H, J = 5,2 Hz), 4,12 (d, 2H, J = 8,0 Hz), 3,76 (t, 2H, J = 6,0 Hz), 3,65-3,49 (m, 21H), 3,45-3,42 (m, 2H), 3,36-3,32 (m, 4H), 2,59-2,54 (m, 4H), 2,28-2,20 (m, 4H), 1,59-1,54 (m, 2H), 1,38-1,25 (m, 2H), 0,93-0,91 (m, 2H).

*Ejemplo 36. Síntesis de (61)*

30 A una solución de **57** (0,15 g, 1,0 mmol) en DCM (15 ml) se añadió CSI (87 µL, 0,14 g, 1,0 mmol), Et<sub>3</sub>N (279 µL, 202 mg, 2,0 mmol) y una solución de H<sub>2</sub>N-PEG<sub>3</sub>-OH (251 mg, 1,3 mmol) en DCM (1 ml). Después de agitar durante 2,5 h, la mezcla de reacción se detuvo mediante la adición de una solución de NH<sub>4</sub>Cl (sat., 20 ml). Después de la separación, la capa acuosa se extrajo con DCM (20 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en columna en gradiente (MeOH 0 → 10% en DCM). Producto **61** se obtuvo como un aceite espeso incoloro (254 mg, 0,57 mmol, 57%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 6,81 (br. s, 1H), 4,26 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 3,80-3,70 (m, 4H), 3,70-3,58 (m, 10H), 3,36 (t, J = 4,7 Hz, 2H), 2,36-2,16 (m, 6H), 1,64-1,49 (m, 2H), 1,40 (quinteto, J = 8,7 Hz, 1H), 1,04-0,92 (m, 2H).

*Ejemplo 37. Síntesis de (62)*

40 A una solución de **61** (242 mg, 0,54 mmol) en DCM (30 mL) se añadió cloroformiato de *p*-nitrofenilo (218 mg; 1,08 mmol) y Et<sub>3</sub>N (226 µL, 164 mg, 1,62 mmol). La mezcla se agitó durante 17 h y se enfrió con agua (20 ml). Después de la separación, la capa orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna en gradiente (EtOAc/pentano 1/1 → EtOAc) para proporcionar el producto **62** (259 mg, 0,38 mmol). LRMS (ESI) m/z calcd. para C<sub>33</sub>H<sub>42</sub>N<sub>5</sub>O<sub>16</sub>S (M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) = 796,23; encontrada 796,52.

*Ejemplo 38. Síntesis de BCN-sulfamida-pireno (26)*

45 El compuesto **62** (40 mg, 0,11 mmol) se disolvió en DCM (10 ml) y se añadió **49** (34 mg, 0,13 mmol) y Et<sub>3</sub>N (30 µL, 0,21 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 4 h, se concentró a presión reducida y se purificó en cromatografía en columna ultrarrápida en gradiente (DCM → DCM:MeOH 96:4). Las fracciones que contenían el producto se lavaron con NaHCO<sub>3</sub> sat. (3 x 100 ml), se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron al vacío para proporcionar **26** (25 mg, 36%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8,29-8,26 (m, 2H), 8,19-8,11 (m, 4H), 8,06-7,97 (m, 4H), 6,87 (d, 1H, J = 12 Hz), 5,78 (br. s, 2H), 5,12 (d, 2H, J = 5,6 Hz), 4,31-4,26 (m, 2H), 3,97 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 3,69-3,62 (m, 4H), 3,28 (m, 2H), 2,18-1,96 (m, 7H), 1,28 (m, 1H), 0,79-0,74 (m, 2H).

*Ejemplo 39. Síntesis de DIBAC-PEG<sub>4</sub>-pireno (27)*

El compuesto **45** (75 mg, 0,22 mmol) se disolvió en DCM (3 ml) seguido de la adición de ácido amino-PEG<sub>4</sub>-carboxílico (53 mg, 0,20 mmol) y Et<sub>3</sub>N (83 µL, 0,6 mmol). Después de agitar durante una noche, se añadió **45**

adicional (25 mg, 0,07 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h adicional. Después de completar la conversión (basada en un análisis de TLC), se añadió N-hidroxisuccinimida (5 mg, 0,04 mmol) y EDC.HCl (70 mg, 0,36 mmol) y la reacción se agitó durante una noche a ta. A la mezcla de reacción se añadió **64** (60 mg, 0,2 mmol) y Et<sub>3</sub>N (50 µL, 0,36 mmol) y después de 1 h la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. Una purificación por cromatografía en columna ultrarrápida en gradiente (DCM → DCM:MeOH 9:1) proporcionó un producto **27** (12 mg, 8%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8,61 (d, 1H, J = 9,2 Hz), 8,23-8,21 (m, 2H), 8,17-8,10 (m, 4H), 8,07-8,02 (m, 3H), 7,59 (d, 1H, J = 7,2 Hz), 7,38-7,18 (m, 7H), 7,06 (bs, 1H), 6,45 (m, 1H), 5,00 (d, 1H, J = 13,6), 3,86-3,79 (m, 3H), 3,70-3,19 (m, 14H), 2,42-2,38 (m, 1H), 2,19-2,15 (m, 2H), 1,89-1,85 (m, 1H).

*Ejemplo 40. Síntesis de DIBAC-PEG<sub>8</sub>-pireno (28)*

El compuesto **45** (24 mg, 0,07 mmol) se disolvió en DCM (1 mL) seguido por la adición de ácido amino-PEG<sub>8</sub>-carboxílico (27 mg, 0,06 mmol) y Et<sub>3</sub>N (14 µL, 0,10 mmol). Después de agitar durante 2 h, se añadió **45** adicional (10 mg, 0,03 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante un tiempo. Posteriormente, se añadió NHS (10 mg, 0,08 mmol) y EDC.HCl (17 mg, 0,09 mmol) y la reacción se agitó durante 2 h. A continuación, se añadió **64** (21 mg, 0,08 mmol) y Et<sub>3</sub>N (14 µL, 0,10 mmol) y después de 4 h, la reacción se detuvo mediante la adición de agua (3 mL). La capa orgánica se lavó con agua (2 x 3 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a presión reducida. Una purificación por cromatografía ultrarrápida en columna (DCM → DCM:MeOH 93:7) proporcionó el producto (8 mg, 14%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8,55 (d, 1H, J = 9,2 Hz), 8,19-7,86 (m, 7H), 7,59 (d, 1H, J = 6,8 Hz), 7,33-7,18 (m, 8H), 6,99 (m, 1H), 6,45 (m, 1H), 5,03 (d, 1H, J = 14,0), 3,78-3,74 (m, 3H), 3,65-3,29 (m, 29H), 2,43-2,37 (m, 1H) 2,25-2,21 (m, 2H), 1,91-1,84 (m, 1H).

*Ejemplo 41. Síntesis de (65)*

El compuesto **45** (50 mg, 0,14 mmol) se disolvió en DCM (3 ml) seguido por la adición de 2-aminoetanol (10 µL, 0,16 mmol) y Et<sub>3</sub>N (30 µL, 0,22 mmol). Después de 2 h, se añadió 2-aminoetanol adicional (10 µL, 0,16 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante una noche a ta. Posteriormente, se añadió agua (5 ml) y la capa orgánica se lavó con agua (3 x 5 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a vacío. La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida en gradiente (DCM → DCM:MeOH 97:3) proporcionó un producto **65** (32 mg, 79%). LRMS (ESI<sup>+</sup>) m/z calcd. para C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) = 290,12; encontrada 290,30.

*Ejemplo 42. Síntesis de DIBAC-sulfamida-pireno (29)*

El compuesto **65** (26 mg, 0,09 mmol) se disolvió en DCM (2 ml) seguido de la adición de CSI (8 µL, 0,09 mmol). Después de 5 min, se añadió Et<sub>3</sub>N (37 µL, 0,27 mmol) y **64** (26 mg, 0,09 mmol) y la reacción se agitó durante 2 horas a ta, después de lo cual la reacción se detuvo mediante la adición de NH<sub>4</sub>Cl acuoso (sat., 5 ml). La capa orgánica se lavó con agua (3 x 5 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró al vacío. Una purificación por cromatografía en columna ultrarrápida en gradiente (DCM → DCM:MeOH 95:5) proporcionó el producto **29** (10 mg, 17%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8,49 (d, 1H, J = 9,2 Hz), 8,25-8,18 (m, 3H), 8,11-7,95 (m, 5H), 7,38-7,00 (m, 8H), 6,05 (m, 1H), 5,96 (m, 1H), 4,62-4,58 (m, 1H), 4,52-4,47 (m, 1H), 4,11-4,08 (m, 1H), 3,81-3,78 (m, 1H), 3,64-3,60 (m, 1H), 3,06 (d, 1H, J = 14 Hz), 2,90-2,87 (m, 2H), 2,17-2,09 (m, 1H), 1,62-1,56 (m, 2H).

*Ejemplo 43-1. Síntesis de (30)*

Una solución de solución de BCN-PEG<sub>4</sub>-C(O)OSu (**60a**, 7,1 mg, 0,013 mmol) y Et<sub>3</sub>N (9,1 µL, 6,6 mg, 65,5 µmol) en 1 ml de DMF se añadió a H-Ahx-maitansina.TFA (10 mg, 0,011 mmol). La reacción se agitó durante 20 h a temperatura ambiente y posteriormente se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía HPLC de fase inversa (C18) (30 → 90% de MeCN (1% de AcOH) en H<sub>2</sub>O (1% de AcOH)). El producto **30** se obtuvo como un líquido incoloro (8,9 mg, 7,5 µmol, 68%). LRMS (ESI<sup>+</sup>) m/z calcd. para C<sub>60</sub>H<sub>87</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>16</sub> (M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O) = 1168,58; encontrada 1168,87.

*Ejemplo 43-2. Síntesis de BCN-PEG<sub>12</sub>-C(O)OSu*

A una solución de ácido amino-dPEG<sub>12</sub> (43 mg, 0,069 mmol) en DMF anhidro (1 ml) se añadió **51** (22 mg, 0,076 mmol) y trietilamina 24 µL, 0,174 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 5 horas a ta, después de lo cual se añadió EDCI.HCl (27 mg, 0,139 mmol) y NHS (8 mg, 0,076 mmol). La solución resultante se agitó durante una noche a ta y se vertió en 10 ml de NaHCO<sub>3</sub> sat. y 10 ml de DCM. Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con H<sub>2</sub>O (2 x 10 ml). Las capas de agua combinadas se extrajeron con DCM (10 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron al vacío. Una cromatografía en columna ultrarrápida en gradiente (MeCN → MeCN:H<sub>2</sub>O 20:1,10:1) proporcionó BCN-PEG<sub>12</sub>-C(O)OSu.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 4,14 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 3,85 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 3,69-3,60 (m, 44 H), 3,56 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 3,36 (q, J = 5,2 Hz, 2H), 2,91 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,84 (s, 4H), 2,36-2,17 (m, 6H), 1,65-1,51 (m, 2H), 1,44-1,23 (, J = 8,4 Hz, 1H), 1,00-0,88 (m, 2H). LRMS (ESI<sup>+</sup>) m/z calcd. para C<sub>42</sub>H<sub>70</sub>N<sub>2</sub>O<sub>18</sub> (M+H<sup>+</sup>) = 892,0; encontrada 891,6.

*Ejemplo 44. Síntesis de (31)*



Una solución de BCN-PEG<sub>12</sub>-C(O)OSu (14 mg, 15,7 μmol) y Et<sub>3</sub>N (9,1 μl, 6,6 mg, 65,5 μmol) en 1,1 ml de DMF se añadió a H-Ahx-maitansina.TFA (10 mg, 0,011 mmol). Después de 18 h, se añadió 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (2,3 μl, 2,3 mg, 16 μmol) y la mezcla se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía HPLC de fase inversa (C18) (30 → 90% de MeCN (1% de AcOH) en H<sub>2</sub>O (1% de AcOH)). El producto **31** se obtuvo como una película incolora (6,6 mg, 4,3 μmol, 39%). LRMS (ESI<sup>+</sup>) m/z calcd. para C<sub>75</sub>H<sub>118</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>25</sub> (M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O) = 1520,79; encontrada 1520,96.

#### Ejemplo 45. Síntesis de BCN-PEG<sub>24</sub>-C(O)OSu

A una solución de ácido amino-dPEG<sub>24</sub> (48 mg, 0,042 mmol) en DMF anhidro (1 ml) se añadió **51** (14 mg, 0,048 mmol) y trietilamina (17 μL, 0,125 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante una noche, después de lo cual se añadió DCM (10 ml) y ácido cítrico (10% de solución acuosa, 5 ml). La fase acuosa se extrajo con DCM (15 ml) y las capas orgánicas combinadas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Después de la filtración, se eliminó el disolvente al vacío. El producto crudo se disolvió de nuevo en DMF anhidra (1 ml) y se añadió EDCI.HCl (17 mg, 0,088 mmol) y NHS (8 mg, 0,070 mmol). La solución resultante se agitó durante una noche a ta, después de lo cual se añadió un equivalente de adición de EDCI.HCl (16 mg) y NHS (7 mg). Después de 6 h, la mezcla de reacción se vertió en 10 ml de NaHCO<sub>3</sub> sat. y 15 ml de EtOAc. Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> sat. (10 mL) y H<sub>2</sub>O (10 ml). La fase orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró al vacío. Una cromatografía en columna ultrarrápida en gradiente (MeCN → MeCN:H<sub>2</sub>O 20:1,10:1, 5:1) proporcionó BCN-PEG<sub>24</sub>-C(O)OSu como un aceite incoloro (32 mg, 0,022 mmol, 54%).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 4,08 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 3,78 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 3,63-3,54 (m, 92 H), 3,49 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 3,30 (q, J = 5,2 Hz, 2H), 2,84 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,78 (s, 4H), 2,29-2,08 (m, 6H), 1,59-1,43 (m, 2H), 1,35-1,23 (m, 1H), 0,93-0,80 (m, 2H). LRMS (ESI<sup>+</sup>) m/z calcd. para C<sub>66</sub>H<sub>118</sub>N<sub>2</sub>O<sub>30</sub> (M+H<sup>+</sup>) = 1420,66; encontrada 1420,0.

#### Ejemplo 46. Síntesis de (32)

Una solución de BCN-PEG<sub>24</sub>-C(O)OSu (25 mg, 17,6 μmol) y Et<sub>3</sub>N (9,1 μl, 6,6 mg, 65,5 μmol) en 0,78 ml de DMF se añadió a H-Ahx-maitansina.TFA (10 mg, 0,011 mmol).

Después de 18 h, se añadió 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (2,3 μl, 2,3 mg, 16 μmol) y la mezcla se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía HPLC de fase inversa (C18) (30 → 90% de MeCN (1% de AcOH) en H<sub>2</sub>O (1% de AcOH)). El producto se obtuvo como una película incolora (11,4 mg, 5,5 μmol, 50%). LRMS (ESI<sup>+</sup>) m/z calcd. para C<sub>100</sub>H<sub>171</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>37</sub><sup>3+</sup> (M+3H<sup>+</sup>)/3 = 690,05; encontrada 690,05.

#### Ejemplo 47. Síntesis de (33)

Se añadió una solución de H-Ahx-maitansina.TFA (20 mg, 0,023 mmol) en DMF (2 ml) a una solución de **62** (14 mg, 0,023 mmol) y Et<sub>3</sub>N (9,5 μl, 6,9 mg, 0,068 mmol) en DMF (2 ml) y la mezcla de reacción resultante se agitó durante 24 h. El compuesto del título **33** se obtuvo con un rendimiento cuantitativo después de una cromatografía en columna de gel de sílice (29 mg, +99%). La prueba de identidad se realizó en el estadio ADC.

#### Ejemplo 48. Síntesis de (34)

Una solución de **60a** (6,6 mg, 0,012 mmol) y Et<sub>3</sub>N (6,8 μl, 4,9 mg, 48,5 μmol) en 1 ml de DMF se añadió a H-Val-Cit-PABA-duocarmicina (10 mg, 0,0097 mmol). Después de 18 h, se añadió 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (1,8 μl, 1,8 mg, 12 μmol) y la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía HPLC de fase inversa (C18) (30 → 90% de MeCN (1% de AcOH) en H<sub>2</sub>O (1% de AcOH)). El producto **34** se obtuvo como una película incolora (7,5 mg, 5,1 μmol, 53%). LRMS (ESI<sup>+</sup>) m/z calcd. para C<sub>71</sub>H<sub>94</sub>ClN<sub>10</sub>O<sub>21</sub> (M+H<sup>+</sup>) = 1457,63; encontrada 1456,89.

#### Ejemplo 49. Síntesis de (35)

Una solución de **62** (6,0 mg, 9,8 μmol) y Et<sub>3</sub>N (6,8 μl, 4,9 mg, 48,5 μmol) en DMF (1 ml) se añadió a H-Val-Cit-PABA-duocarmicina (10 mg, 0,0097 mmol). Después de 22 h, se añadió 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (2,8 μl, 2,8 mg, 19 μmol). Después de 1 h, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía HPLC de fase inversa (C18) (30 → 90% de MeCN (1% de AcOH) en H<sub>2</sub>O (1% de AcOH)). El producto **35** se obtuvo como un sólido blanco (6,4 mg, 4,2 μmol, 44%). LRMS (ESI<sup>+</sup>) m/z calcd. para C<sub>69</sub>H<sub>92</sub>ClN<sub>12</sub>O<sub>22</sub>S (M+H<sup>+</sup>) = 1507,59; encontrada 1508,00.

#### Ejemplo 50. Síntesis de (36)

A una solución de **58** (229 mg, 0,64 mmol) en DCM (20 ml) se añadió cloroforniato de *p*-nitrofenilo (128 mg, 0,64 mmol) y Et<sub>3</sub>N (268 μL, 194 mg, 1,92 mmol). La mezcla se agitó durante una noche a ta y posteriormente se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gradiente (20 → 70% de EtOAc en heptano (1% de AcOH) para proporcionar el derivado de carbonato de PNP de **58** como un sólido blanco (206 mg, 0,39 mmol, 61%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8,31-8,26 (m, 2H), 7,45-7,40 (m, 2H), 5,56 (t, J = 6,0

Hz, 1H), 4,48-4,40 (m, 2H), 4,27 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 3,81-3,75 (m, 2H), 3,68 (t,  $J = 5,0$  Hz, 2H), 3,38-3,30 (m, 2H), 2,36-2,14 (m, 6H), 1,61-1,45 (m, 2H), 1,38 (quinteto,  $J = 8,7$  Hz, 1H), 1,04-0,94 (m, 2H).

A continuación, a una solución de PNP-derivado de **58** (4,1 mg, 7,8  $\mu\text{mol}$ ) y  $\text{Et}_3\text{N}$  (3,3  $\mu\text{L}$ , 2,4 mg, 23,4  $\mu\text{mol}$ ) en DMF (1 ml) se añadió una solución de H-Val-Cit-PABA-Ahx-maitansina (10 mg, 8,6  $\mu\text{mol}$ ) en DMF (100  $\mu\text{L}$ ). Después de 20 h, se añadió 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (5,7  $\mu\text{L}$ , 5,6 mg, 38  $\mu\text{mol}$ ) y la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía HPLC de fase inversa (C18) (30  $\rightarrow$  90% de MeCN (1% de AcOH) en  $\text{H}_2\text{O}$  (1% de AcOH) para proporcionar **36** (2,2 mg, 1,4  $\mu\text{mol}$ , 18%). LRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  calcd. para  $\text{C}_{73}\text{H}_{103}\text{ClN}_{11}\text{O}_{21}\text{S}$  ( $\text{M}-18+\text{H}^+$ ) = 1536,67; encontrada 1537,08.

#### Ejemplo 51. Síntesis de (66)

A una solución agitada de **57** (500 mg, 3,33 mmol) en DCM (100 ml) se añadió CSI (290  $\mu\text{l}$ , 471 mg, 3,33 mmol). Después de 20 min, se añadió posteriormente  $\text{Et}_3\text{N}$  (1,4 ml, 1,0 g, 10 mmol) y una solución de dietanolamina.HCl (571 mg, 4,0 mmol) en DMF (5 ml). Después de 45 minutos adicionales, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gradiente (0  $\rightarrow$  15% de MeOH en DCM). El producto **66** se obtuvo como un aceite espeso incoloro (767 mg, 2,13 mmol, 64%).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 4,26 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 3,87 (t,  $J = 4,9$  Hz, 4H), 3,55 (t,  $J = 4,9$  Hz, 4H), 2,37-2,16 (m, 6H), 1,65-1,45 (m, 2H), 1,39 (quinteto,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 1,05-0,92 (m, 2H).

#### Ejemplo 52. Síntesis de (67)

A una suspensión de **66** (206 mg, 0,57 mmol) en DCM (20 ml) se añadió  $\text{Et}_3\text{N}$  (318  $\mu\text{L}$ , 231 mg, 2,28 mmol) y cloroformiato de *p*-nitrofenilo (230 mg, 1,14 mmol, 2 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante 28 h a ta y posteriormente se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gradiente (20  $\rightarrow$  75% de EtOAc en heptano), proporcionando **67** como un aceite espeso ligeramente amarillo (83 mg, 0,12 mmol, 21%).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8,31-8,24 (m, 4H), 7,43-7,34 (m, 4H), 4,53 (t,  $J = 5,4$  Hz, 2H), 4,22 (d,  $J = 4,2$  Hz, 2H), 3,87 (t,  $J = 5,4$  Hz, 4H), 2,35-2,15 (m, 6H), 1,55-1,40 (m, 2H), 1,35 (quinteto,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 1,03-0,92 (m, 2H).

#### Ejemplo 53. Síntesis de (37)

Una solución de **67** (2,7 mg, 3,9  $\mu\text{mol}$ ) y  $\text{Et}_3\text{N}$  (2,7  $\mu\text{L}$ , 2,0 mg, 19,5  $\mu\text{mol}$ ) en DMF (1 ml) se añadió a una solución de H-Val-Cit-PABA-Ahx-maitansina (10 mg, 0,0086 mmol) en DMF (100  $\mu\text{L}$ ). La mezcla se dejó reaccionar durante una noche a ta y posteriormente se concentró. Se añadió una solución de 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (2,8  $\mu\text{l}$ , 2,8 mg, 19  $\mu\text{mol}$ ) en DMF (1 ml). La mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó por cromatografía HPLC de fase inversa (C18) (30  $\rightarrow$  90% de MeCN (1% de AcOH) en  $\text{H}_2\text{O}$  (1% de AcOH) para proporcionar el compuesto **37** (4,8 mg, 1,7  $\mu\text{mol}$ , 45%). LRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  calcd. para  $\text{C}_{131}\text{H}_{186}\text{Cl}_2\text{N}_{20}\text{O}_{38}\text{S}$  ( $\text{M}+2\text{H}^+$ )/2 = 1375,12; encontrada 1375,51.

#### Ejemplo 54. Síntesis de (68)

A una solución agitada de **58** (47 mg, 0,13 mmol) en DCM (10 ml) se añadió CSI (11  $\mu\text{l}$ , 18 mg, 0,13 mmol). Después de 30 min, se añadió  $\text{Et}_3\text{N}$  (91  $\mu\text{l}$ , 66 mg, 0,65 mmol) y una solución de dietanolamina (16 mg, 0,16 mmol) en DMF (0,5 ml). Después de 30 minutos, se añadió cloroformiato de *p*-nitrofenilo (52 mg, 0,26 mmol) y  $\text{Et}_3\text{N}$  (54  $\mu\text{L}$ , 39 mg, 0,39 mmol). Después de 4,5 h adicionales, la mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gradiente (33  $\rightarrow$  66% de EtOAc/heptano (1% de AcOH)) para proporcionar **68** como un aceite incoloro (88 mg, 0,098 mmol, 75%).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8,28-8,23 (m, 4H), 7,42-7,35 (m, 4H), 4,52 (t,  $J = 5,4$  Hz, 4H), 4,30 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H), 4,27-4,22 (m, 2H), 3,86 (t,  $J = 5,3$  Hz, 4H), 3,69-3,65 (m, 2H), 3,64-3,59 (m, 2H), 3,30-3,22 (m, 2H), 2,34-2,14 (m, 6H), 1,62-1,46 (m, 2H), 1,38 (quinteto,  $J = 8,7$  Hz, 1H), 1,04-0,92 (m, 2H).

#### Ejemplo 55. Síntesis de (38)

Una solución de **68** (3,9 mg, 4,3  $\mu\text{mol}$ ) y  $\text{Et}_3\text{N}$  (3,0  $\mu\text{l}$ , 2,2 mg, 21,5  $\mu\text{mol}$ ) en DMF (1 ml) se añadió a una solución de H-Val-Cit-PABA-Ahx-maitansina (10 mg, 8,6  $\mu\text{mol}$ ) en DMF (100  $\mu\text{l}$ ). La mezcla se dejó reaccionar durante la noche y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía HPLC de fase inversa (C18) (30  $\rightarrow$  90% de MeCN (1% AcOH) en  $\text{H}_2\text{O}$  (1% de AcOH) para proporcionar el producto **38** (3,9 mg, 1,32  $\mu\text{mol}$ , 31%). LRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  calcd. para  $\text{C}_{136}\text{H}_{196}\text{Cl}_2\text{N}_{22}\text{O}_{43}\text{S}_2$  ( $\text{M}+2\text{H}^+$ )/2 = 1480,13; encontrada 1480,35. LRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  calcd. para  $\text{C}_{85}\text{H}_{119}\text{ClN}_{14}\text{O}_{31}\text{S}_2$  ( $\text{M}+2\text{H}^+$ )/2 = 965,36; encontrada 965,54.

Como producto secundario, se aisló el derivado de Ahx-maitansina monosustituido de **68** (no representado). LRMS (ESI<sup>+</sup>) calculada para  $\text{C}_{85}\text{H}_{119}\text{ClN}_{14}\text{O}_{31}\text{S}_2$  ( $\text{M}+2\text{H}^+$ )  $m/z$  965,36 encontrada 965,54.

#### Ejemplo 56. Síntesis de (39)

Al derivado de Ahx-maitansina monosustituido de **68**, aislado como un producto secundario en el ejemplo 55, se añadió una solución de  $\text{Et}_3\text{N}$  (0,7  $\mu\text{L}$ , 0,5 mg, 5  $\mu\text{mol}$ ) en DMF (1 mL) y una solución de 1,2 mg (1,1  $\mu\text{mol}$ ) de H-Val-Cit-PABA-MMAF. La mezcla se dejó reaccionar durante una noche y se añadió 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (1  $\mu\text{l}$ ,

1,0 mg, 6,7  $\mu$ mol). Después de 15 min, la mezcla de reacción se concentró. Una cromatografía HPLC de fase inversa (C18) (30  $\rightarrow$  90% de MeCN (1% de AcOH) en H<sub>2</sub>O (1% de AcOH) proporcionó 1,0 mg del producto deseado. LRMS (ESI<sup>+</sup>) m/z calcd. para C<sub>137</sub>H<sub>206</sub>N<sub>23</sub>O<sub>41</sub>S<sub>2</sub> (M+2H<sup>+</sup>)/2 = 1464,69; encontrada 1465,66.

*Ejemplo 57. Determinación del tiempo de retención de la HPLC*

5 Muestras de los compuestos **19-38** se inyectaron en un sistema de HPLC equipado con una columna Phenomenex Luna C18(2) 5  $\mu$ , 150  $\times$  4,6 mm, 100 Å y eluyeron con un gradiente de 10% de MeCN (0,1% de TFA)/90% de agua (0,1% de TFA) hasta 90% de MeCN (0,1% de TFA)/10% de agua (0,1% de TFA) o un gradiente de 10% de MeCN/90% de tampón de fosfato de potasio 10 mM, pH 7,4 hasta 90% de MeCN/10% de tampón de fosfato de potasio 10 mM, pH 7,4. Los tiempos de retención obtenidos para estos compuestos se muestran en la Tabla 3.

10 Programa del tiempo:

0-12 min: 10% de MeCN hasta 90% de MeCN

12-14 min: 90% de MeCN

14-15 min: 90% de MeCN hasta 10% de MeCN

15-17 min: 10% de MeCN

15 *Tabla 3. Tiempos de retención de los compuestos 19-23 y 30-38 en RP-HPLC.*

compuesto	tiempo de retención (min)	
	0,1% de TFA	pH 7,4
<b>19</b> (comp.)	11,4	11,4
<b>20</b>	11,6	9,6
<b>21</b>	11,6	9,2
<b>22</b> (comp.)	12,7	12,6
<b>23</b>	10,6	6,9
<b>30</b> (comp.)	10,5	10,6
<b>31</b> (comp.)	10,1	10,1
<b>32</b> (comp.)	9,7	9,7
<b>33</b>	10,4	9,3
<b>34</b> (comp.)	11,5	11,5
<b>35</b>	11,6	10,0
<b>36</b>	10,4	9,3
<b>37</b>	11,2	10,5
<b>38</b>	11,1	9,5

*Ejemplo 58. Conjugación por competencia de 17 frente a 18 con trastuzumab(N300C)*

20 Trastuzumab(N300C) (100  $\mu$ M) se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en PBS con EDTA 30 mM y TCEP 1 mM (10 eq.). El tampón se intercambió a PBS, después de lo cual el trastuzumab(N300C) (66,7  $\mu$ M) parcialmente reducido se incubó con ácido deshidroascórbico 1,33 mM (20 eq.). El trastuzumab(N300C) reoxidado (66,7  $\mu$ M) se incubó con maleimida **17** 0,4 mM (6 eq.) y maleimida **18** 0,4 mM (6 eq.). Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, la reacción se inactivó mediante la adición de un exceso 5 veces molar de N-acetilcisteína. Los productos de la reacción se digirieron con Fabricator<sup>®</sup> (comprado en Genovis) y se analizaron mediante análisis MS (AccuTOF). Aproximadamente el 45% del fragmento Fc se conjugaba con maleimida **18** (24297 Da, masa esperada = 24299) y aproximadamente el 35% del fragmento Fc se conjugaba con maleimida **17** (24319 Da, masa esperada = 24323). El 20% restante de los fragmentos Fc consiste en varias formas no conjugadas (que oscilan desde 23776 hasta 23874 Da).

*Ejemplo 59. Conjugación de 19-39 con 13b o 13c*

30 A una solución del trastuzumab(azida)<sub>2</sub> adecuada (8,8  $\mu$ l, 0,2 mg, 22,7 mg/ml en tampón Tris pH 7,5 10 mM) se añadió tampón Tris pH 7,5 10 mM (4  $\mu$ L) y el sustrato (2  $\mu$ L, solución 2 mM en MiliQ + 5% de DMA). La reacción se

incubó a *ta* y las muestras (2  $\mu$ L) se tomaron en puntos de tiempo preestablecidos. Esas muestras se incubaron con DTT (2  $\mu$ L 0,2 M), se diluyeron con MiliQ (30  $\mu$ L) y se sometieron a análisis MS (AccuTof) para determinar la eficacia de la conjugación (véase la Tabla 1 y 2).

*Ejemplo 60. Agregación*

- 5 Se investigó la tendencia a la agregación para los conjugados de **36**, **37** y **38** con trastuzumab(F<sub>2</sub>-GalNAz)<sub>2</sub> (**13c**), preparados de acuerdo con el ejemplo 59. Los ADCs se incubaron en PBS pH 7,4 a una concentración de 1 mg/ml a 37°C. El nivel de agregación se analizó utilizando una columna Superdex200 PC 3.2/30 (GE Healthcare) después de 0, 1 y 2 semanas. Los resultados se muestran en la Figura 23. La agregación permaneció por debajo del 1% al pasar de la relación de fármaco a anticuerpo de 2 (DAR2) del conjugado **36** a la relación de fármaco a anticuerpo de 4 (DAR4) del conjugado **37**, lo que indicaba el potencial del espaciador de sulfamida para compensar el aumento de la lipofilidad impartida mediante una duplicación del número de cargas útiles. Para el enlazador de bis-sulfamida de **38**, no se observó ninguna agregación. Estos resultados son una mejora notable con respecto a los bioconjugados convencionales preparados por ligación con cicloadición de alquino-azida.
- 10

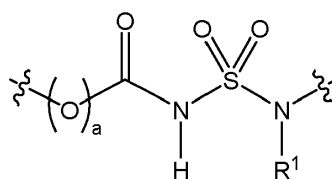
*Ejemplo 61. Agregación*

- 15 La tendencia a la agregación para los conjugados de **30** y **36** con trastuzumab(F<sub>2</sub>-GalNAz)<sub>2</sub> (**13c**), preparados de acuerdo con el ejemplo 59, y para el propio trastuzumab, se vigiló durante un período de 14 días. Los conjugados se almacenaron durante 2 semanas a 40°C a pH 5, y los días 0, 2, 7, 10 y 14 se determinó el grado de agregación. El nivel de agregación se analizó utilizando una columna Superdex200 PC 3.2/30 (GE Healthcare). Los resultados se muestran en la Figura 24. Las condiciones con un estrés incrementado (mayor T, menor pH) en comparación con el ejemplo 61, conducían a un aumento de la agregación. Sin embargo, la agregación se reducía significativamente en el conjugado de acuerdo con la invención (conjugado de **36** con trastuzumab(F<sub>2</sub>-GalNAz)<sub>2</sub> (**13c**)), comparado con el bioconjugado comparativo de **30** con trastuzumab(F<sub>2</sub>-GalNAz)<sub>2</sub> (**13c**), empleando un espaciador PEG<sub>4</sub>. En particular, el mismo trastuzumab no mostraba ninguna tendencia a la agregación, debido a la ausencia de grupos hidrófobos, tales como un resto 1,2,3-triazol fusionado con un ciclooctano y el resto maitansinoide.
- 20

25

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de un bioconjugado, comprendiendo el procedimiento la etapa de conjugar una glicoproteína (B) con un enlazador-conjugado, haciendo reaccionar un grupo reactivo Q<sup>1</sup> del enlazador-conjugado con un grupo funcional F<sup>1</sup> de la glicoproteína (B), en donde el enlazador-conjugado es un compuesto que comprende un extremo alfa y un extremo omega, comprendiendo el compuesto en el extremo alfa un grupo reactivo Q<sup>1</sup> capaz de reaccionar con un grupo funcional F<sup>1</sup> presente en la glicoproteína (B) y en el extremo omega una molécula diana (D) seleccionada a partir del grupo que consiste en un fármaco, un profármaco, un agente de diagnóstico, una proteína, un péptido, un polipéptido, un marcador peptídico, un aminoácido, un glicano, un lípido, una vitamina, un esteroide, un nucleótido, un nucleósido, un polinucleótido, un ARN, un ADN, una molécula informadora, un polímero, una superficie sólida, un hidrogel, una nanopartícula, una micropartícula y una biomolécula, en donde Q<sup>1</sup> es un grupo reactivo seleccionado a partir del grupo que consiste en grupos N-maleimidilo opcionalmente sustituidos, grupos N-alquilamido halogenados, grupos éster activados, grupos tiol, grupos alquinilo, grupos (hetero)cicloalquinilo, grupos tetrazinilo, grupos azido, grupos fosfina, grupos 1,1-bis(sulfonilmetil)-metilcarbonilo, grupos 1,2-quinona o grupos triazina,
- 15 comprendiendo el compuesto adicionalmente un grupo según la fórmula (1) o una sal del mismo:



1

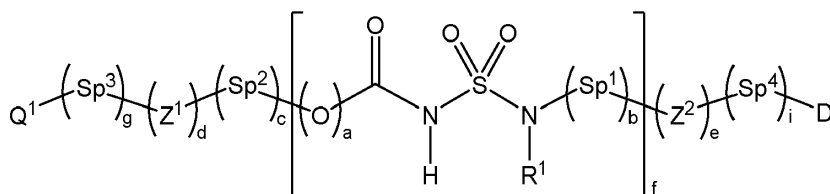
en donde:

a es 0 o 1; y

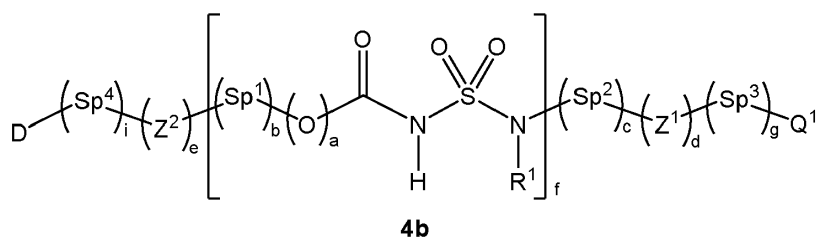
- R<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, los grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir de O, S y NR<sup>3</sup> en donde R<sup>3</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>, o R<sup>1</sup> es una segunda molécula diana D, en donde la segunda molécula diana está conectada opcionalmente con N a través de un resto espaciador; y

en donde el grupo según la fórmula (1), o la sal del mismo, está situado entre dicho extremo alfa y dicho extremo omega del compuesto.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la molécula diana es un fármaco, un profármaco, un agente de diagnóstico, una proteína, un péptido, un polipéptido, un marcador peptídico, un aminoácido, un glicano, un lípido, una vitamina, un esteroide, un nucleótido, un nucleósido, un polinucleótido, un ARN, un ADN, una molécula informadora o un polímero.
3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la reacción es una cicloadición, preferiblemente una reacción de Diels-Alder o una cicloadición 1,3-dipolar.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que Q<sup>1</sup> es un grupo alquinilo, grupos (hetero)cicloalquinilo o un grupo biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo], y F<sup>1</sup> es un grupo azido.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el enlazador-conjugado es según la fórmula (4a) o (4b), o una de sus sales:



4a



en donde:

a es independientemente 0 o 1;

b es independientemente 0 o 1;

5 c es 0 o 1;

d es 0 o 1;

e es 0 o 1;

f es un número entero en el intervalo de 1 a 150;

g es 0 o 1;

10 i es 0 o 1;

D es una molécula diana;

Q<sup>1</sup> es como se define en la reivindicación 1;

Sp<sup>1</sup> es un resto espaciador;

Sp<sup>2</sup> es un resto espaciador;

15 Sp<sup>3</sup> es un resto espaciador;

Sp<sup>4</sup> es un resto espaciador;

Z<sup>1</sup> es un grupo de conexión que conecta Q<sup>1</sup> o Sp<sup>3</sup> con Sp<sup>2</sup>, O o C(O) o N(R<sup>1</sup>);

Z<sup>2</sup> es un grupo de conexión que conecta D o Sp<sup>4</sup> con Sp<sup>1</sup>, N(R<sup>1</sup>), O o C(O); y

20 R<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, los grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir de O, S y NR<sup>3</sup> en donde R<sup>3</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>; o

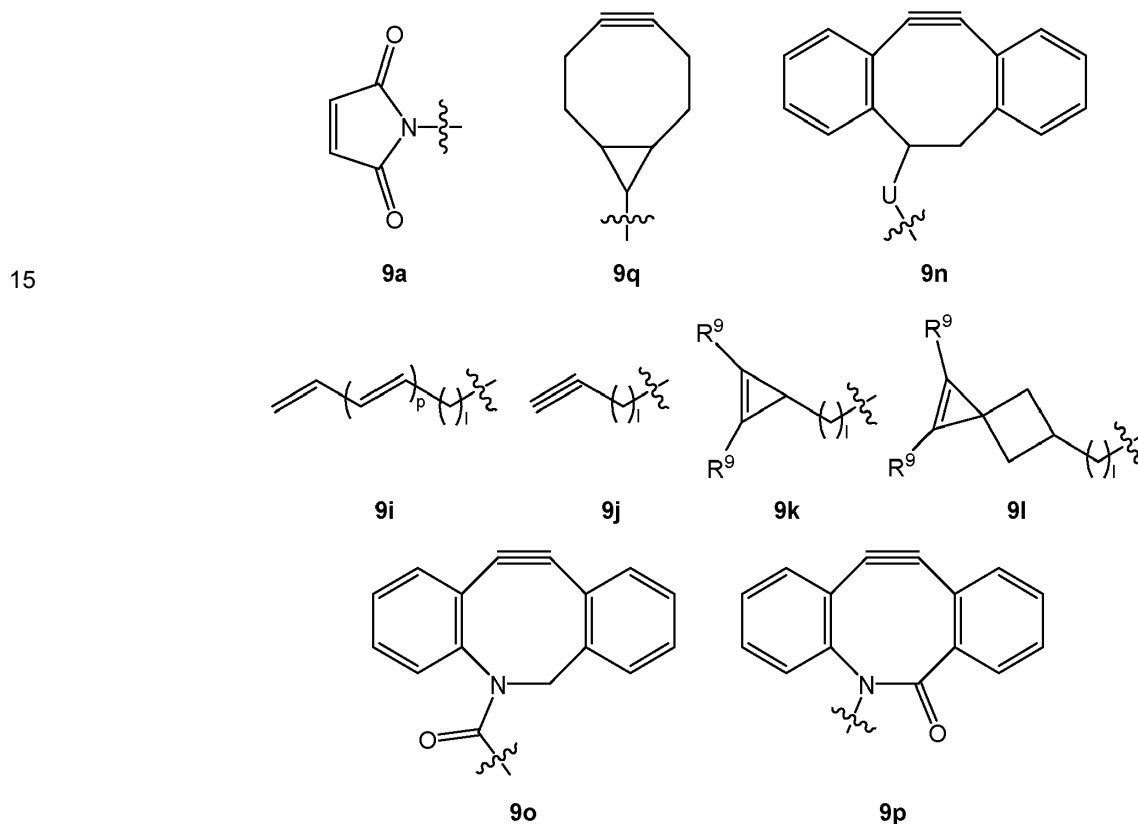
25 R<sup>1</sup> es D, -[(Sp<sup>1</sup>)<sub>b</sub>-(Z<sup>2</sup>)<sub>e</sub>-(Sp<sup>4</sup>)<sub>i</sub>-D] o -[(Sp<sup>2</sup>)<sub>c</sub>-(Z<sup>1</sup>)<sub>d</sub>-(Sp<sup>3</sup>)<sub>g</sub>-Q<sup>1</sup>], en donde Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup>, Sp<sup>4</sup>, Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup>, D, Q<sup>1</sup>, b, c, d, e, g e i son como se han definido anteriormente.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup> y Sp<sup>4</sup> se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en grupos alquilenos C<sub>1</sub> - C<sub>200</sub> lineales o ramificados, grupos alquilenos C<sub>2</sub> - C<sub>200</sub>, grupos alquilenos C<sub>2</sub> - C<sub>200</sub>, grupos cicloalquilenos C<sub>3</sub> - C<sub>200</sub>, grupos cicloalquilenos C<sub>3</sub> - C<sub>200</sub>, grupos cicloalquilenos C<sub>5</sub> - C<sub>200</sub>, grupos cicloalquilenos C<sub>8</sub> - C<sub>200</sub>, grupos alquilarileno C<sub>7</sub> - C<sub>200</sub>, grupos arilalquilenos C<sub>7</sub> - C<sub>200</sub>, grupos arilalquilenos C<sub>8</sub> - C<sub>200</sub> y grupos arilalquilenos C<sub>9</sub> - C<sub>200</sub>, en donde los grupos alquilenos, los grupos alquilenos, los grupos alquilenos, los grupos cicloalquilenos, los grupos cicloalquilenos, los grupos cicloalquilenos, los grupos alquilarileno, los grupos arilalquilenos, los grupos arilalquilenos y los grupos arilalquilenos están opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo de O, S y NR<sup>3</sup>, en donde R<sup>3</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquilenos C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquilenos C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub> y grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, en donde los grupos alquilo, los grupos alquilenos, los grupos alquilenos y los grupos cicloalquilo están opcionalmente sustituidos; y/o

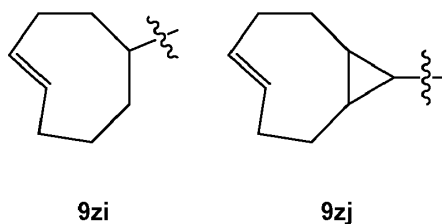
40 en donde Z<sup>1</sup> y Z<sup>2</sup> se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en -O-, -S-, -NR<sup>2</sup>-, -N=N-, -C(O)-, -C(O)NR<sup>2</sup>-, -O-C(O)-, -O-C(O)-O-, -O-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-C(O)-, -NR<sup>2</sup>-C(O)-O-, -NR<sup>2</sup>-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -S-C(O)-, -S-C(O)-O-, -S-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -O-S(O)<sub>2</sub>-, -O-S(O)<sub>2</sub>-O-, -O-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>2</sup>-, -O-S(O)-, -O-S(O)-O-, -O-S(O)-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-C(O)-, -O-NR<sup>2</sup>-C(O)-O-, -O-NR<sup>2</sup>-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-O-C(O)-, -NR<sup>2</sup>-O-C(O)-O-, -NR<sup>2</sup>-O-C(O)-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-

5 C(S)-, -O-NR<sup>2</sup>-C(S)-O-, -O-NR<sup>2</sup>-C(S)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-O-C(S)-, -NR<sup>2</sup>-O-C(S)-O-, -NR<sup>2</sup>-O-C(S)-NR<sup>2</sup>-, -O-C(S)-, -O-C(S)-O-, -O-C(S)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-C(S)-, -NR<sup>2</sup>-C(S)-O-, -NR<sup>2</sup>-C(S)-NR<sup>2</sup>-, -S-S(O)<sub>2</sub>-, -S-S(O)<sub>2</sub>-O-, -S-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)-O-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)-NR<sup>2</sup>-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)<sub>2</sub>-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)<sub>2</sub>-O-, -NR<sup>2</sup>-O-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)-O-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)<sub>2</sub>-O-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>2</sup>-, -O-NR<sup>2</sup>-S(O)<sub>2</sub>-, -O-P(O)(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub>-, -S-P(O)(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub>-, -NR<sup>2</sup>-P(O)(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub>- y combinaciones de dos o más de los mismos, en donde R<sup>2</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alqueno C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquinilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub> y grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, en donde los grupos alquilo, los grupos alqueno, los grupos alquinilo y los grupos cicloalquilo están opcionalmente sustituidos.

10 7. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup> y Sp<sup>4</sup>, si están presentes, se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en grupos alqueno C<sub>1</sub> - C<sub>20</sub> lineales o ramificados, estando los grupos alqueno opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo que consiste en O, S y NR<sup>3</sup>, en donde R<sup>3</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>, y en donde Q<sup>1</sup> es un grupo *trans*-ciclooctenilo o un grupo según la fórmula (9a), (9i), (9j), (9k), (9l), (9q), (9n), (9o) o (9p):



20 en donde p es un número entero en el intervalo de 0 a 10, l es un número entero en el intervalo de 0 a 10, U es O o NR<sup>9</sup>, y R<sup>9</sup> es hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub> lineal o ramificado o un grupo (hetero)arilo C<sub>4</sub> - C<sub>12</sub>, y en donde los anillos aromáticos en (9n) están opcionalmente O-sulfonilados en una o varias posiciones y los anillos de (9o) y (9p) están opcionalmente halogenados en una o varias posiciones, preferiblemente en donde el grupo *trans*-ciclooctenilo es según la fórmula (9zi) o (9zj):

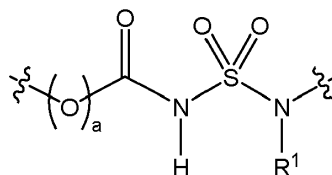


25 8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la glicoproteína es un anticuerpo, preferiblemente en donde el anticuerpo se une específicamente a un antígeno, lo más preferiblemente un antígeno relacionado con el cáncer.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el bioconjugado es un conjugado de anticuerpo-fármaco.

10. Bioconjugado obtenible mediante el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1- 9.

11. Compuesto que comprende un extremo alfa y un extremo omega, comprendiendo el compuesto en el extremo alfa un grupo reactivo Q<sup>1</sup> capaz de reaccionar con un grupo funcional F<sup>1</sup> presente en una glicoproteína y en el extremo omega una molécula diana (D) seleccionada a partir del grupo que consiste en un fármaco, un profármaco, un agente de diagnóstico, una proteína, un péptido, un polipéptido, un marcador peptídico, un aminoácido, un glicano, un lípido, una vitamina, un esteroide, un nucleótido, un nucleósido, un polinucleótido, un ARN, un ADN, una molécula informadora, un polímero, una superficie sólida, un hidrogel, una nanopartícula, una micropartícula y una biomolécula, en donde el compuesto comprende adicionalmente un grupo según la fórmula (1) o una sal del mismo:



1

10 en donde:

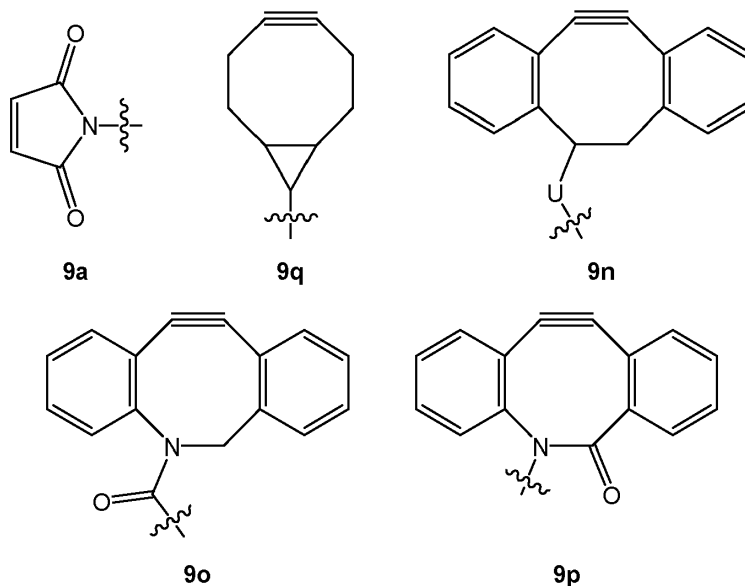
a es 0 o 1;

R<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, los grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir de O, S y NR<sup>3</sup> en donde R<sup>3</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>, o R<sup>1</sup> es una molécula diana D seleccionada a partir del grupo que consiste en un fármaco, un profármaco, un agente de diagnóstico, una proteína, un péptido, un polipéptido, un marcador peptídico, un aminoácido, un glicano, un lípido, una vitamina, un esteroide, un nucleótido, un nucleósido, un polinucleótido, un ARN, un ADN, una molécula informadora, un polímero, una superficie sólida, un hidrogel, una nanopartícula, una micropartícula y una biomolécula, en donde la molécula diana está conectada opcionalmente con N a través de un resto espaciador; y

Q<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en un grupo N-maleimidilo opcionalmente sustituido, un grupo (hetero)cicloalquinilo y un grupo biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo].

12. Compuesto según la reivindicación 11, en el que Q<sup>1</sup> es un grupo (hetero)cicloalquinilo opcionalmente sustituido, lo más preferiblemente un grupo biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilo]; y/o

en donde Q<sup>1</sup> es un grupo según la fórmula (9a), (9q), (9n), (9o) o (9p):

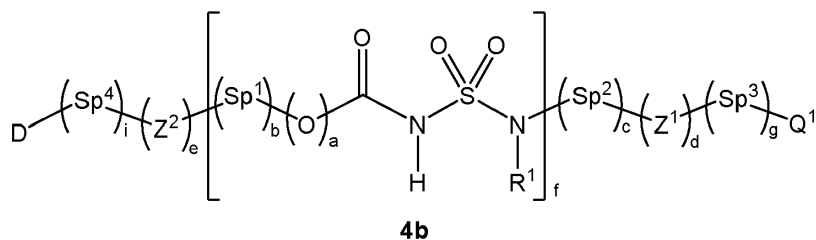
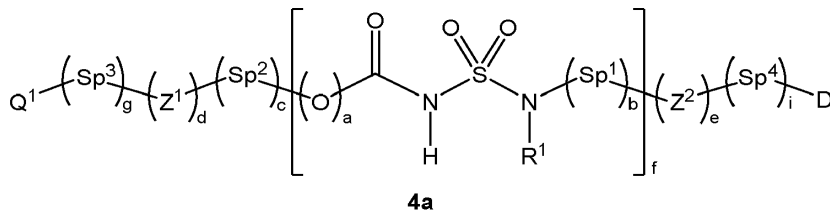


en donde U es O o NR<sup>9</sup>, y R<sup>9</sup> es hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub> lineal o ramificado o un grupo (hetero)arilo C<sub>4</sub> - C<sub>12</sub>, y en donde los anillos aromáticos en (9n) están opcionalmente O-sulfonilados en una o varias posiciones y los



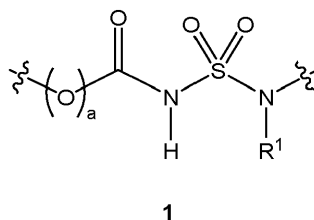
anillos de (9o) y (9p) están opcionalmente halogenados en una o varias posiciones.

13. Compuesto según la reivindicación 11 o 12, en donde el compuesto está de acuerdo con la fórmula (4a) o (4b), o una sal del mismo:



5 en donde a, b, c, d, e, f, g, i, D, Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup>, Sp<sup>4</sup>, Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup> y R<sup>1</sup> son como se han definido en la reivindicación 5, preferiblemente en donde Sp<sup>1</sup>, Sp<sup>2</sup>, Sp<sup>3</sup> y Sp<sup>4</sup>, si están presentes, se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en grupos alquileo C<sub>1</sub> - C<sub>20</sub> lineales o ramificados, estando los grupos alquileo opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo que  
10 consiste en O, S y NR<sup>3</sup>, preferiblemente O, en donde R<sup>3</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>.

14. Compuesto que comprende un extremo alfa y un extremo omega, comprendiendo el compuesto en el extremo alfa una glicoproteína (B) y en el extremo omega una molécula diana (D) seleccionada a partir del grupo que  
15 consiste en un fármaco, un profármaco, un agente de diagnóstico, una proteína, un péptido, un polipéptido, un marcador peptídico, un aminoácido, un glicano, un lípido, una vitamina, un esteroide, un nucleótido, un nucleósido, un polinucleótido, un ARN, un ADN, una molécula reportera, un polímero, una superficie sólida, un hidrogel, una nanopartícula, una micropartícula y una biomolécula, en donde el compuesto comprende además un grupo según la fórmula (1) o una sal del mismo:



20 en donde:

a es 0 o 1; y

R<sup>1</sup> se selecciona a partir del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, los grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub>, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>, grupos alquil(hetero)arilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> y grupos (hetero)arilalquilo C<sub>3</sub> - C<sub>24</sub> opcionalmente sustituidos y opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos  
25 seleccionados a partir de O, S y NR<sup>3</sup> en donde R<sup>3</sup> se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>; o R<sup>1</sup> es una molécula diana D seleccionada a partir del grupo que consiste en un fármaco, un profármaco, un agente de diagnóstico, una proteína, un péptido, un polipéptido, un marcador peptídico, un aminoácido, un glicano, un lípido, una vitamina, un esteroide, un nucleótido, un nucleósido, un polinucleótido, un ARN, un ADN, una molécula informadora, un polímero, una superficie sólida, un hidrogel, una nanopartícula, una micropartícula y una biomolécula, en donde la molécula diana está conectada opcionalmente con N a través de un resto espaciador;

preferiblemente en donde la glicoproteína es un anticuerpo y/o en donde la molécula diana es un fármaco, un profármaco, un agente de diagnóstico, una proteína, un péptido, un polipéptido, un marcador peptídico, un aminoácido, un glicano, un lípido, una vitamina, un esteroide, un nucleótido, un nucleósido, un polinucleótido, un  
35 ARN, un ADN, una molécula informadora o un polímero.

Fig. 1

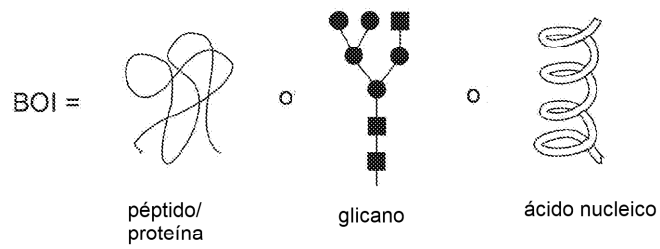
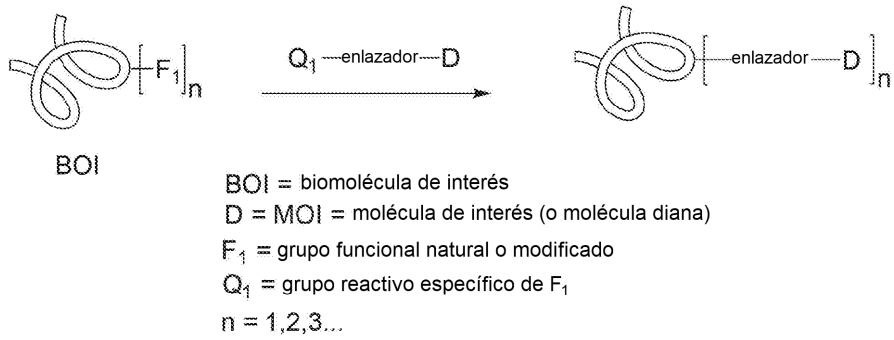


Fig. 2

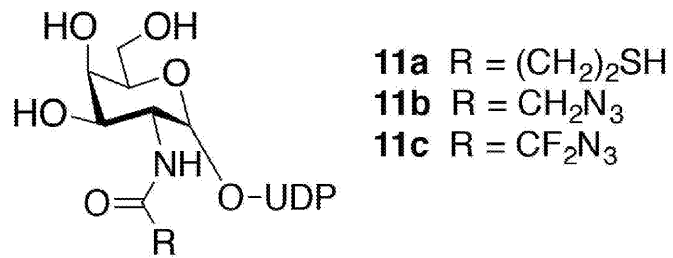


Fig. 3

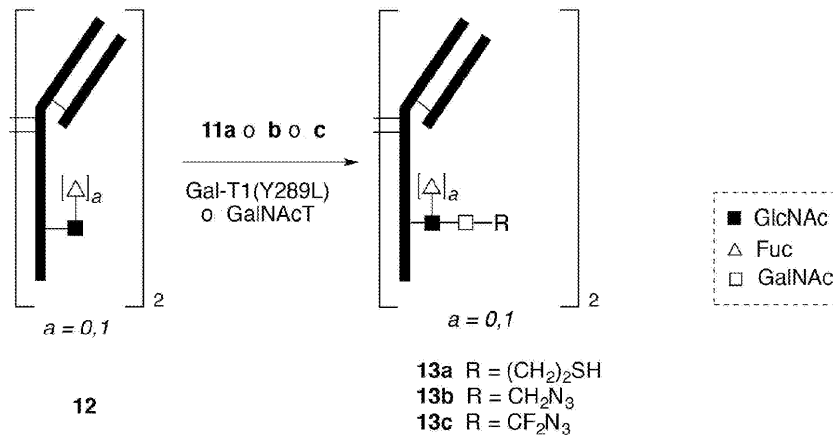


Fig. 4

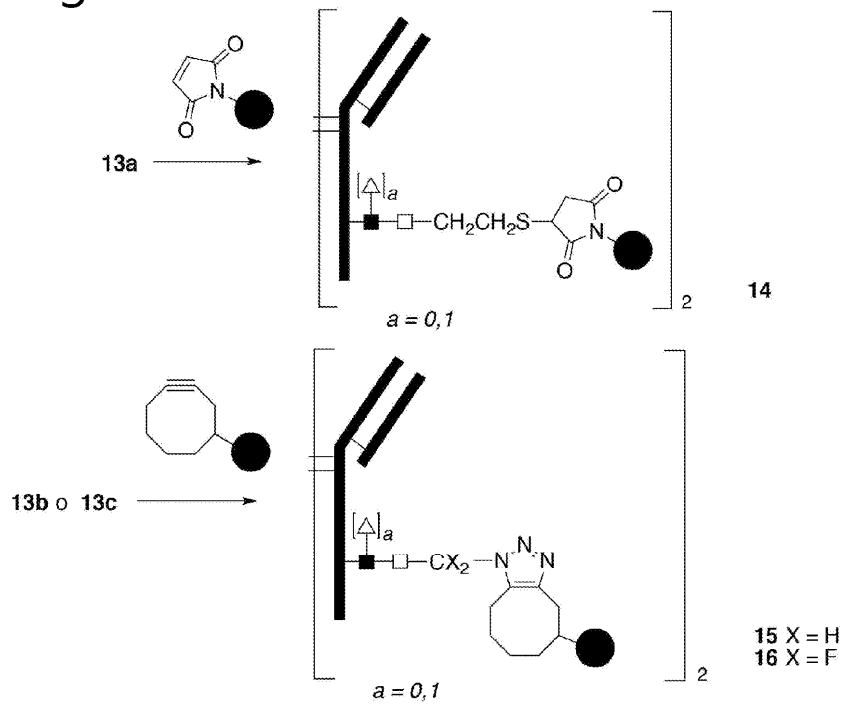


Fig. 5

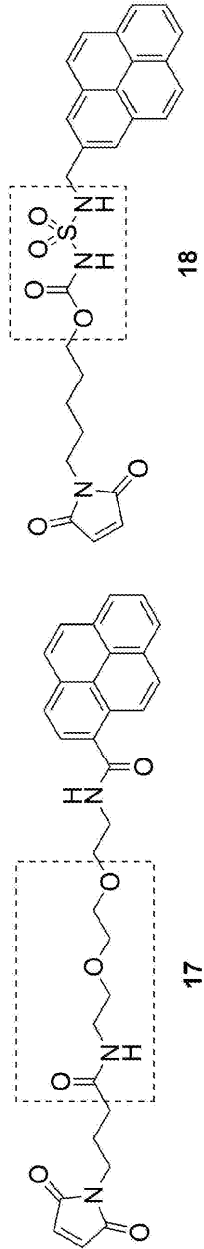


Fig. 6

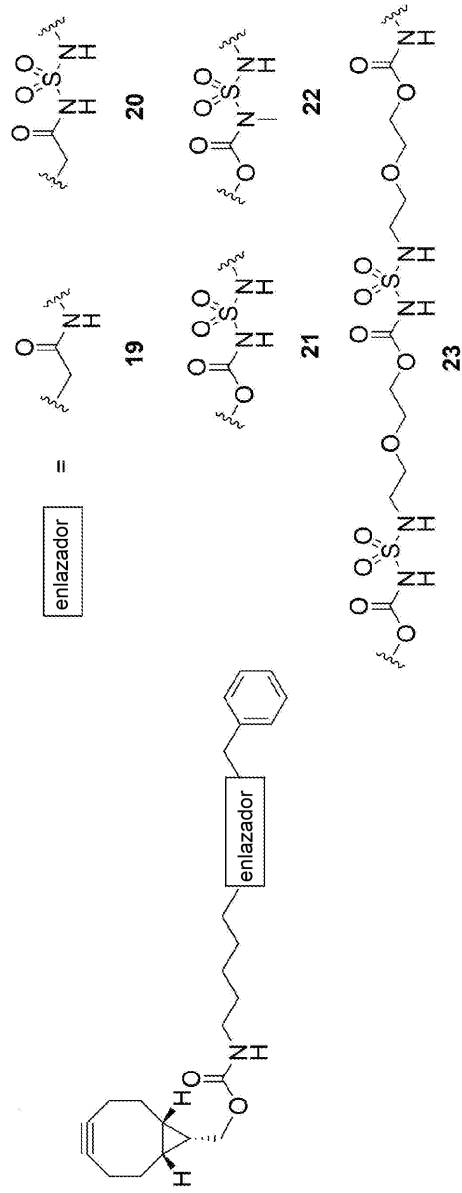


Fig. 7

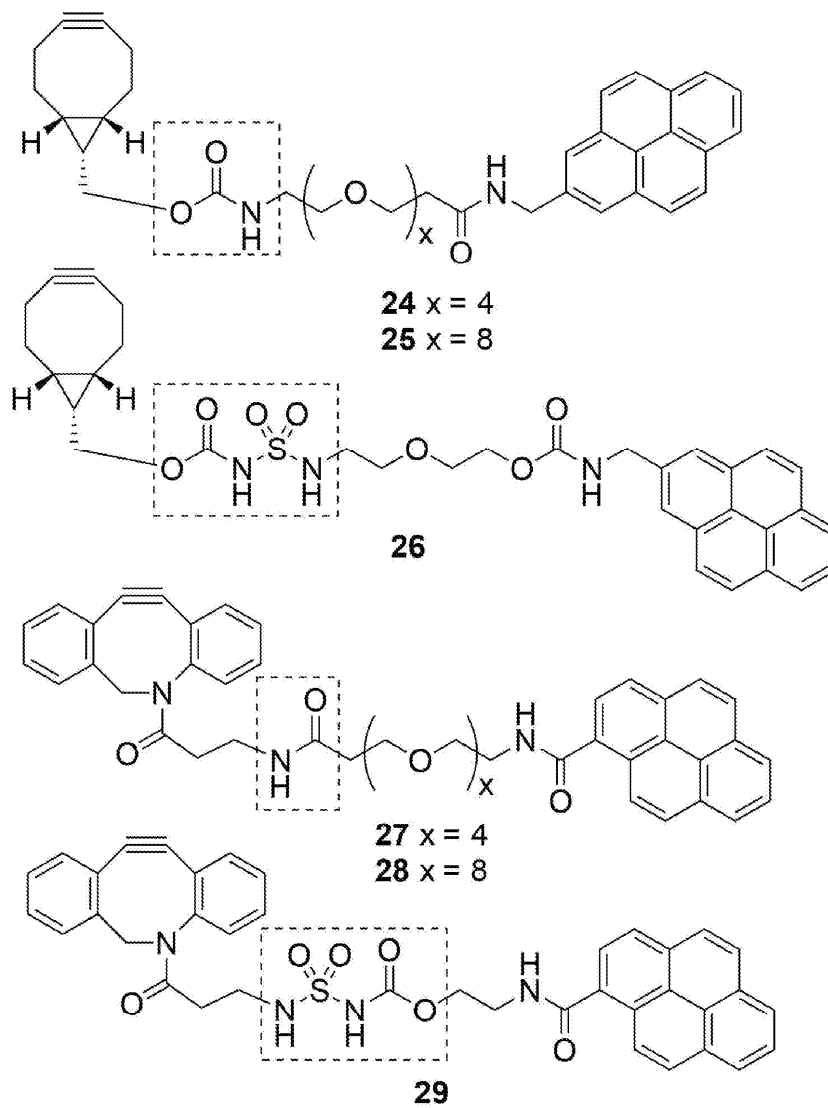
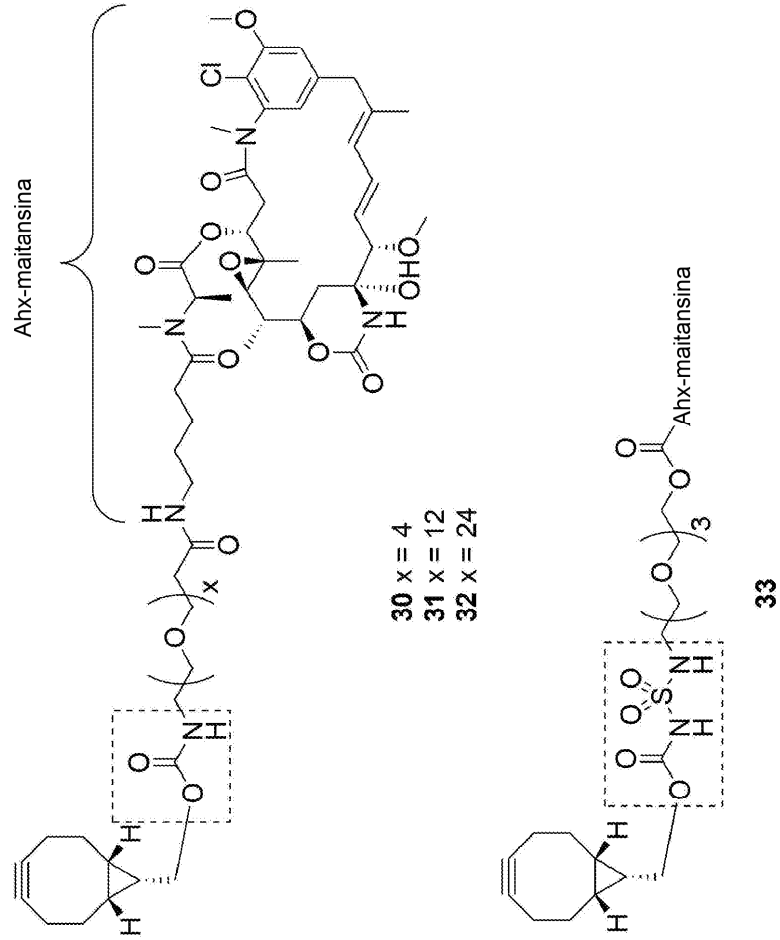


Fig. 8



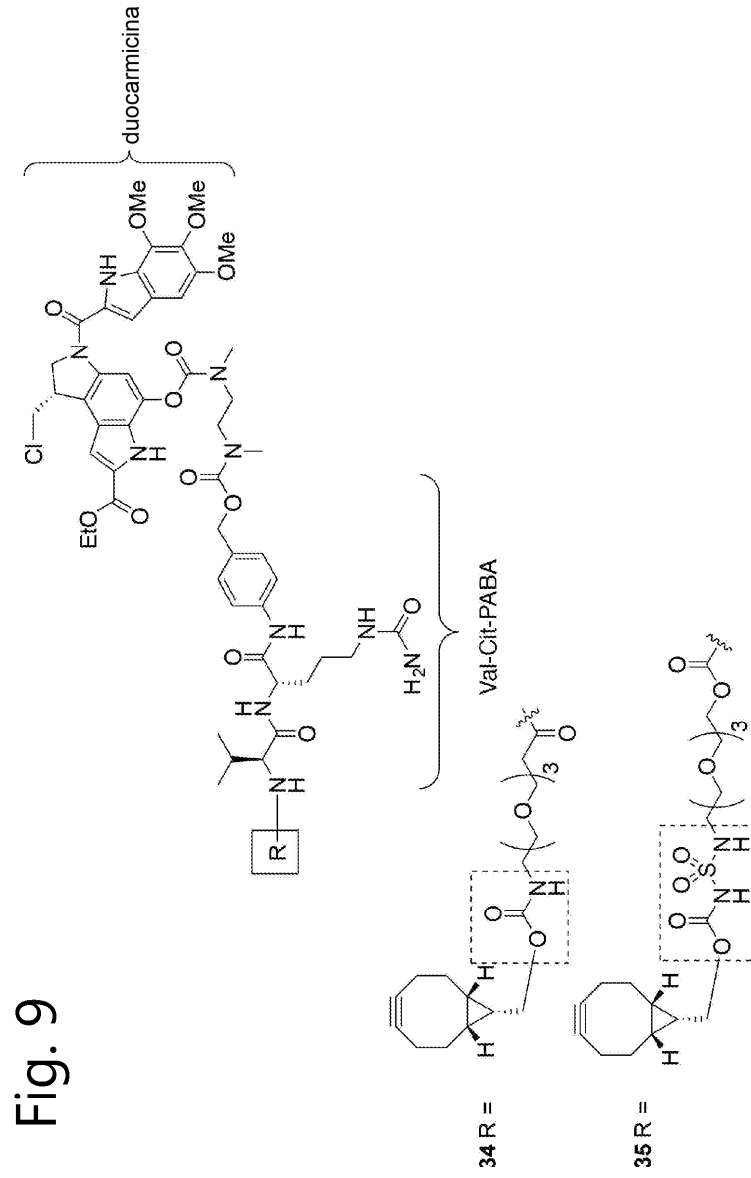


Fig. 10

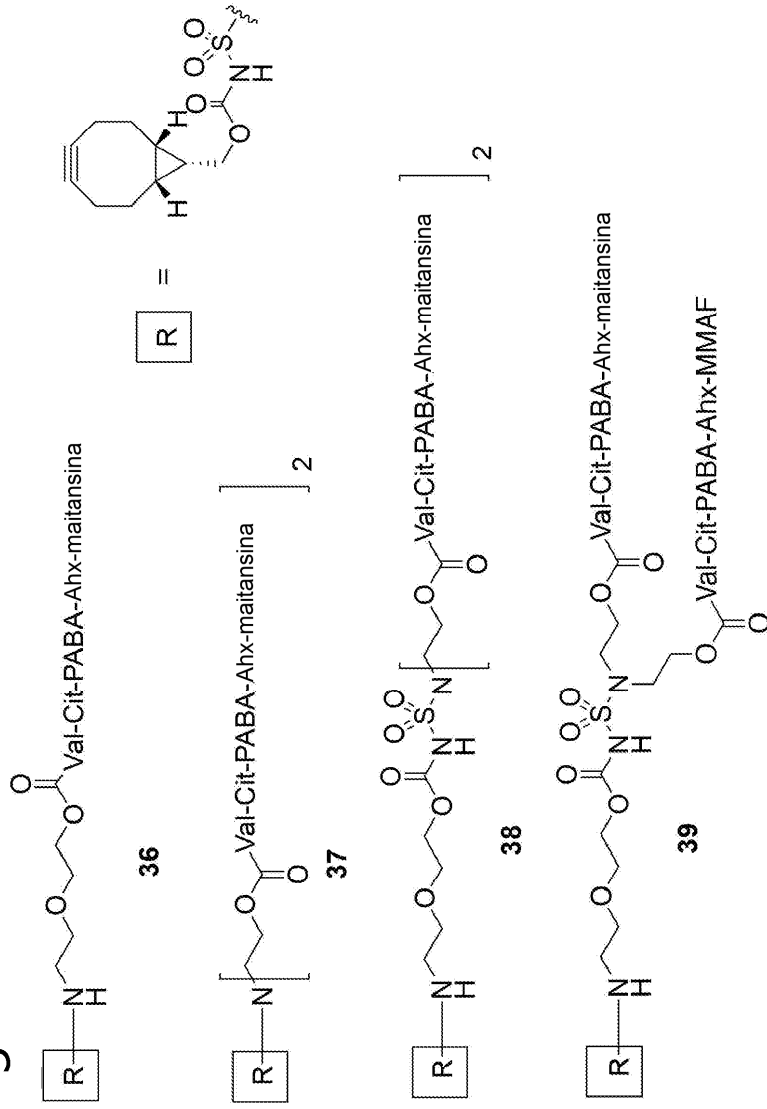




Fig. 11

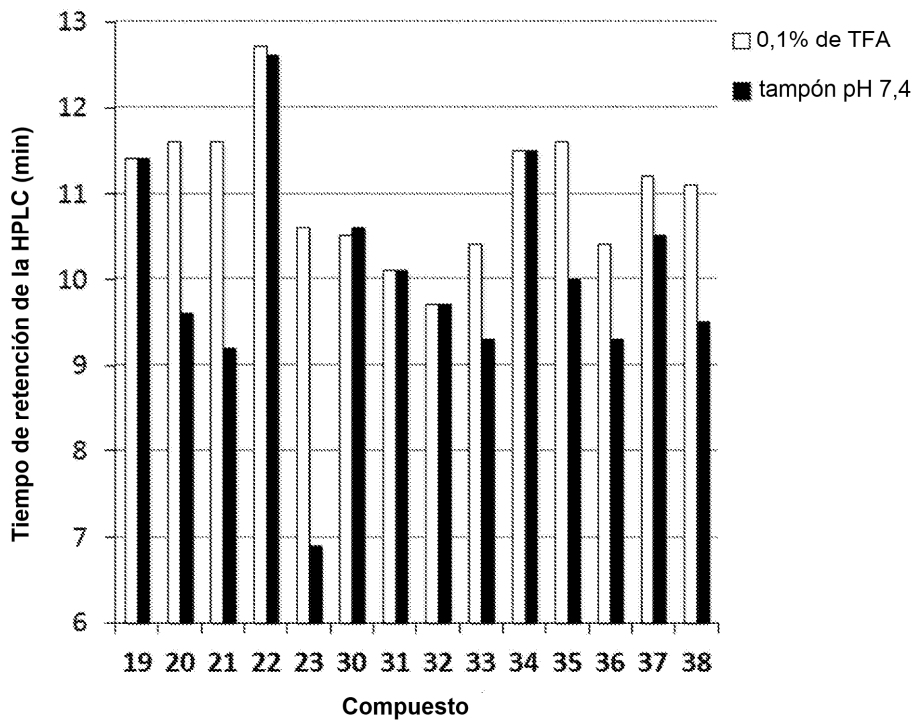


Fig.12a

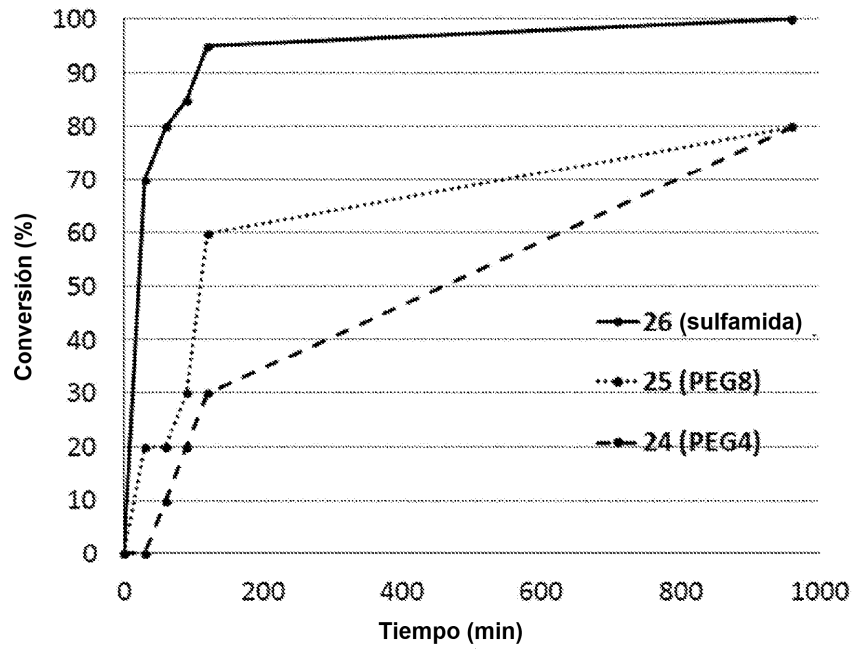


Fig.12b

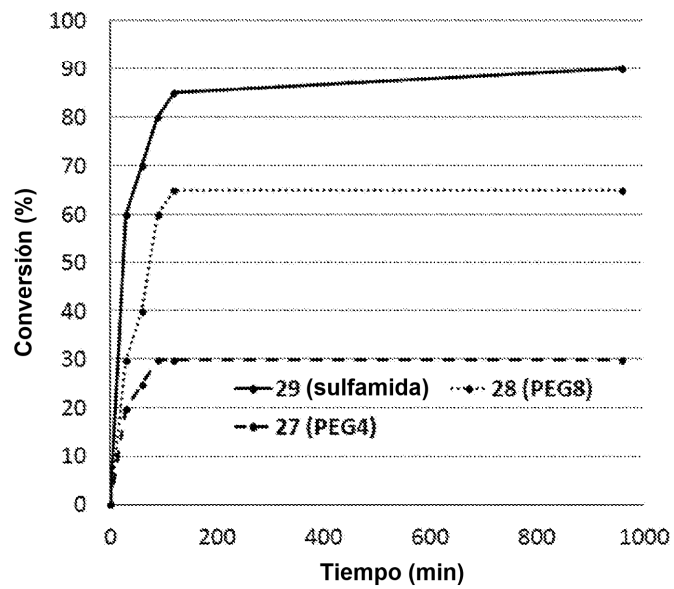


Fig. 13a

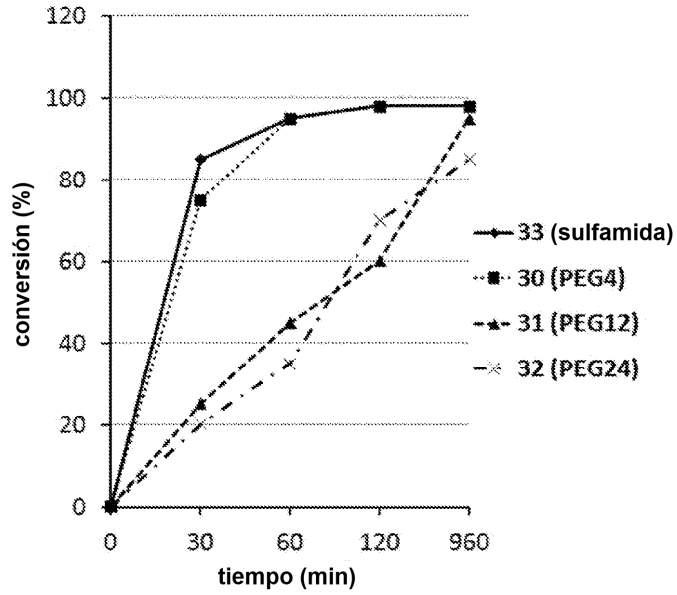


Fig. 13b

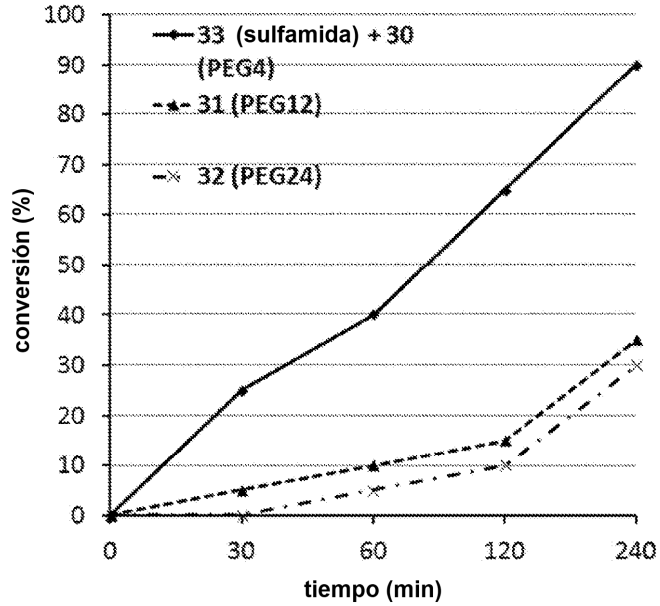


Fig. 14a

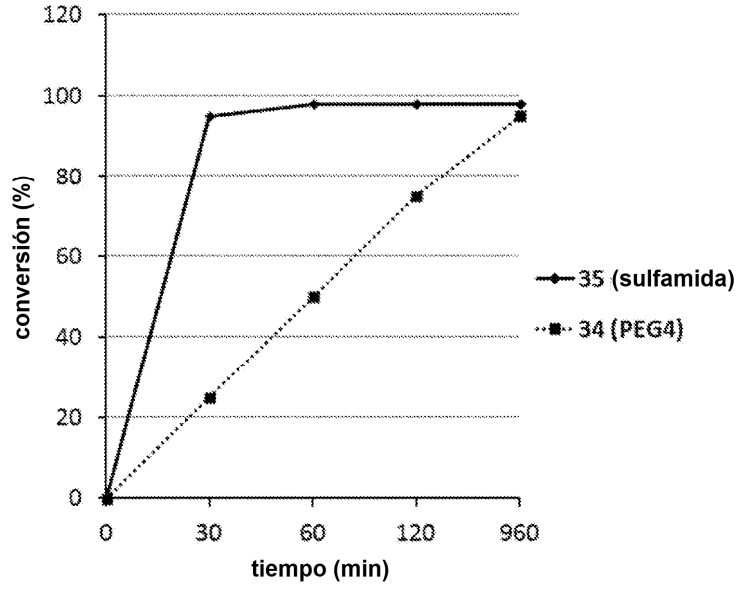


Fig. 14b

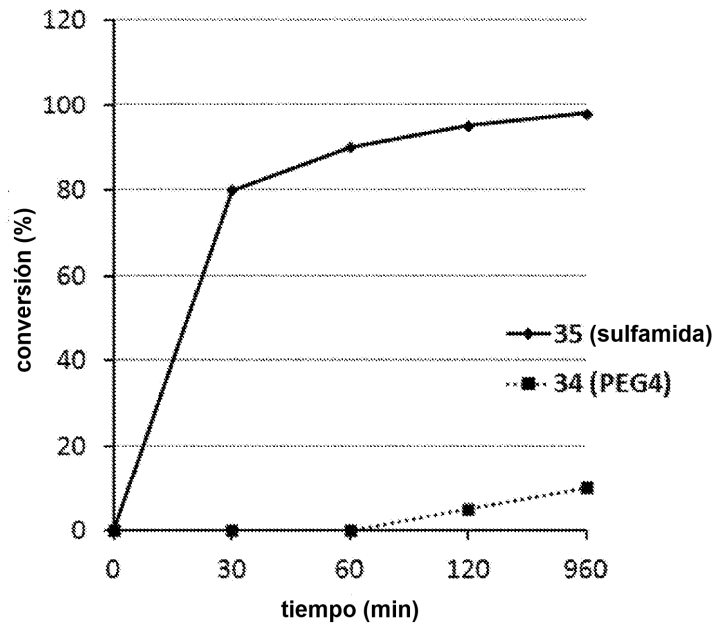


Fig. 15

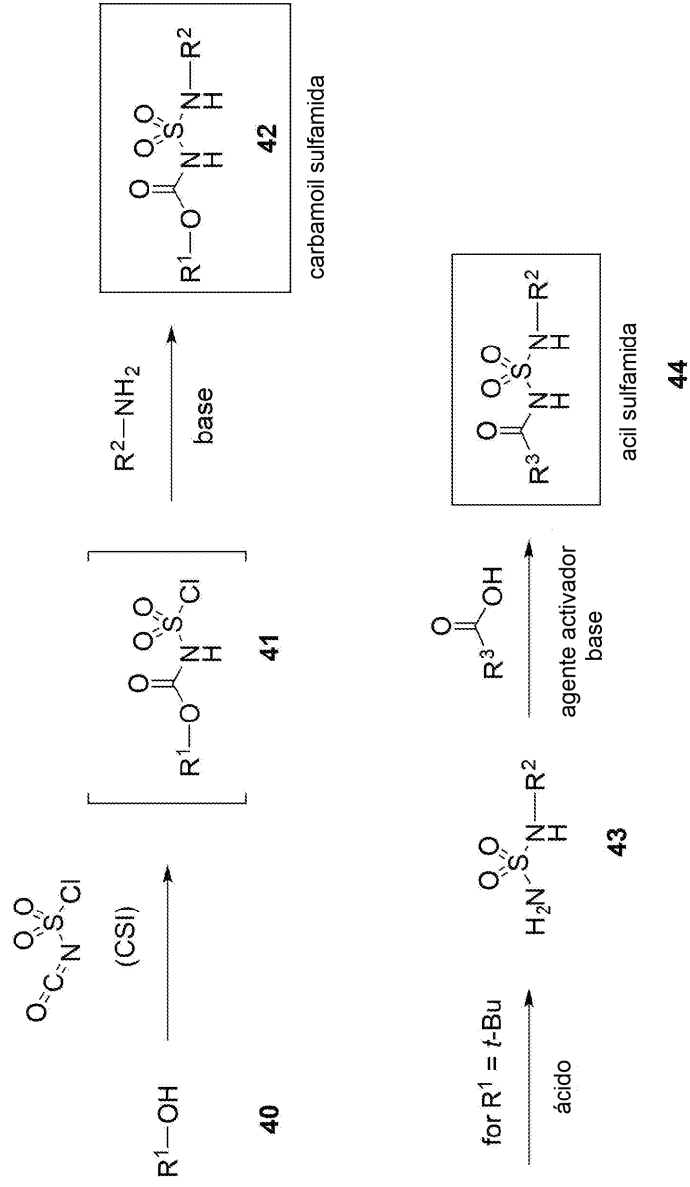


Fig. 16

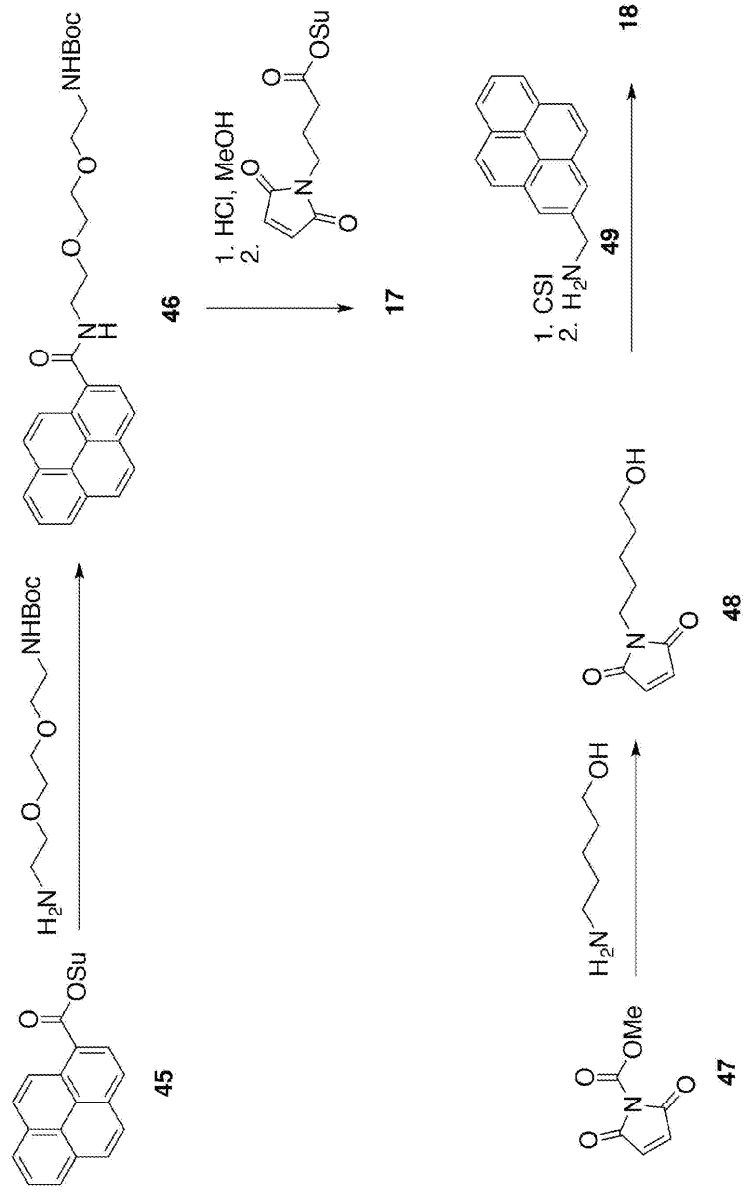


Fig. 17

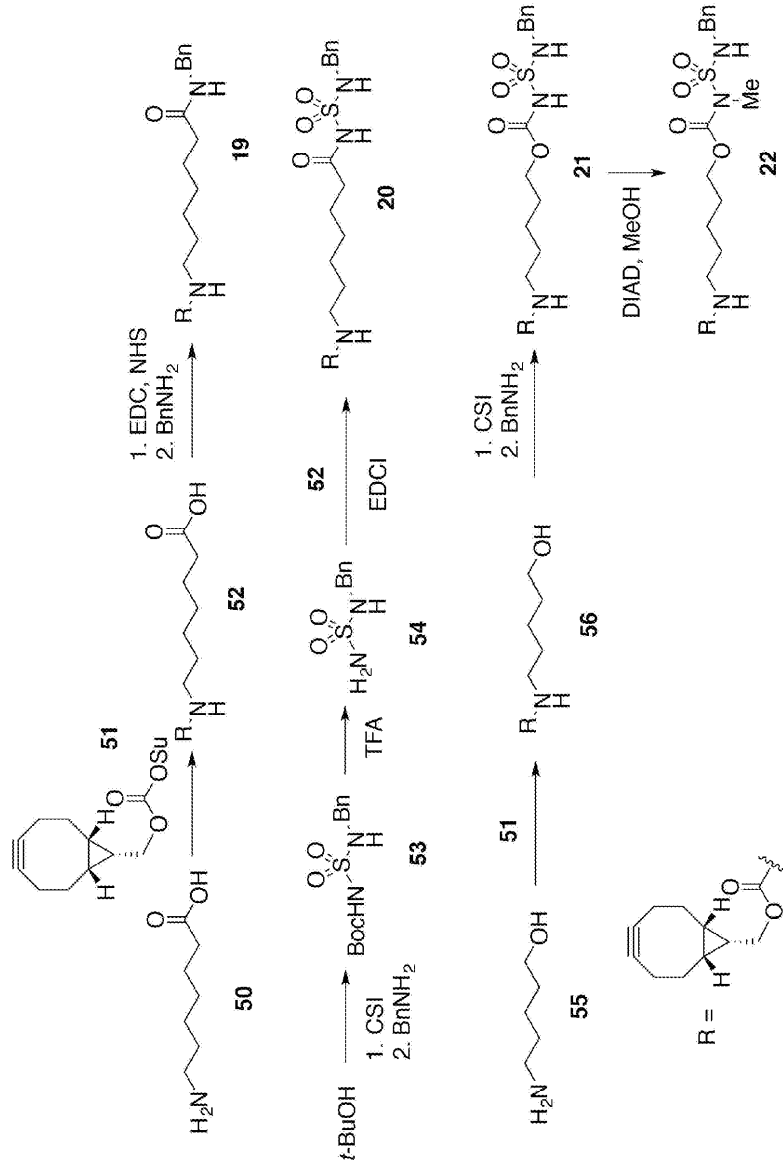


Fig. 18

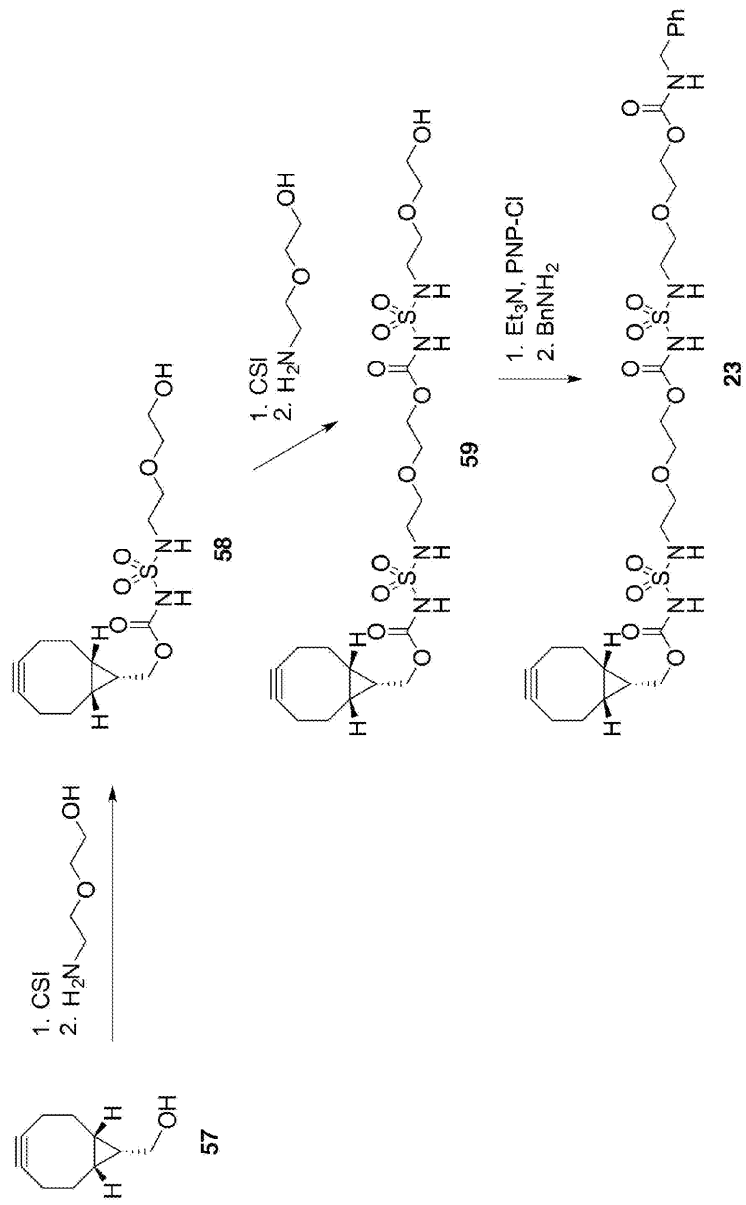




Fig. 19

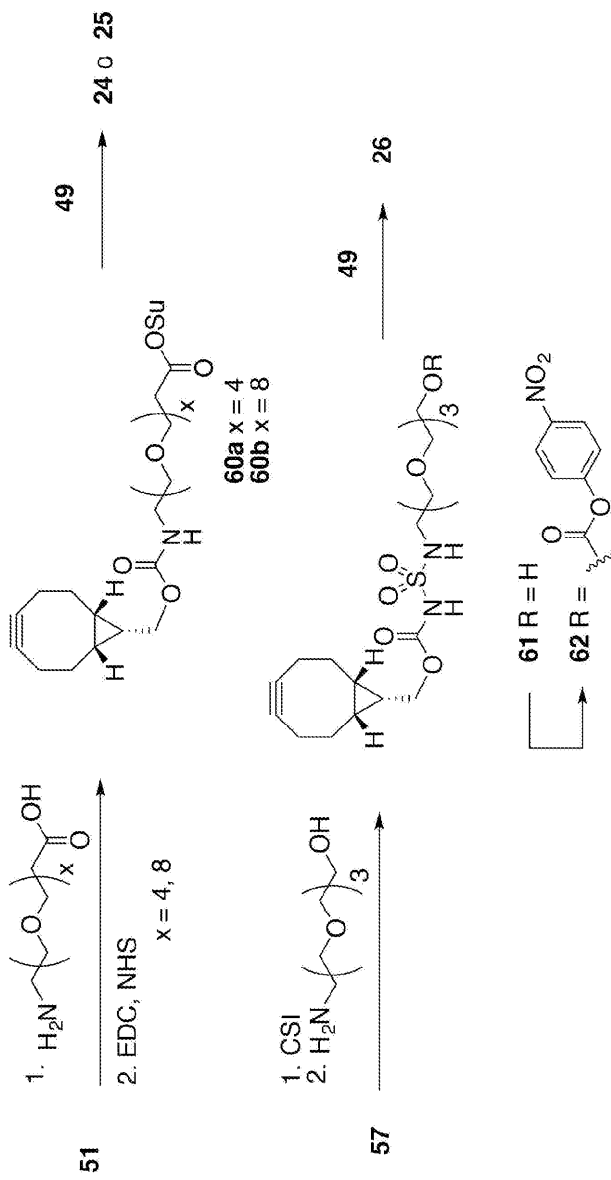


Fig. 20

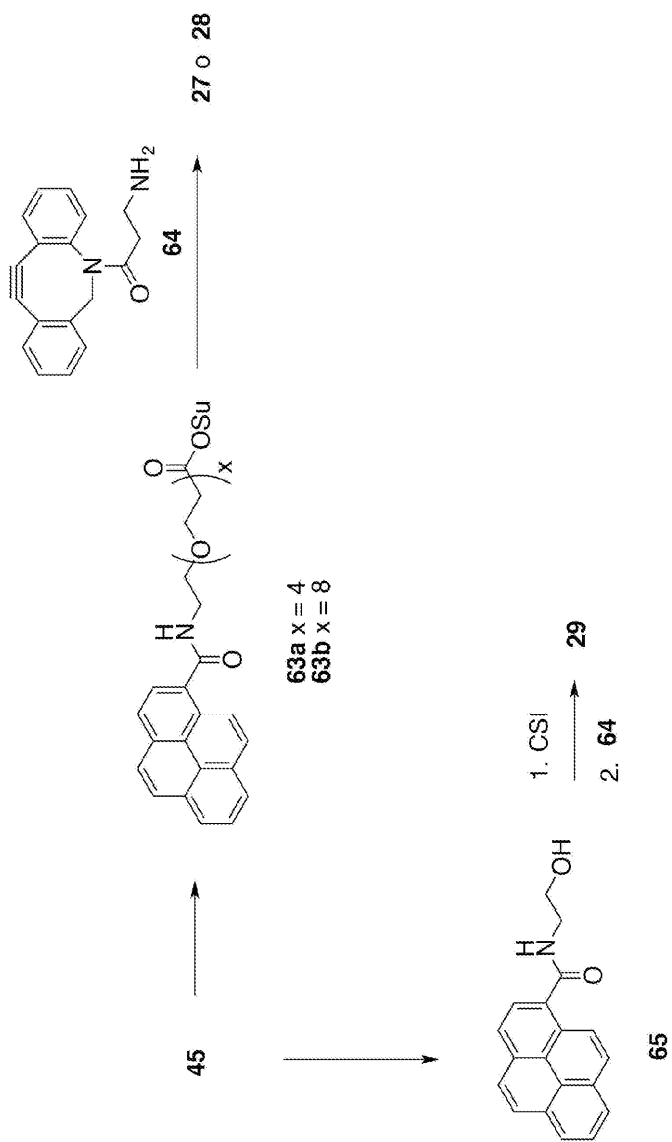


Fig. 21

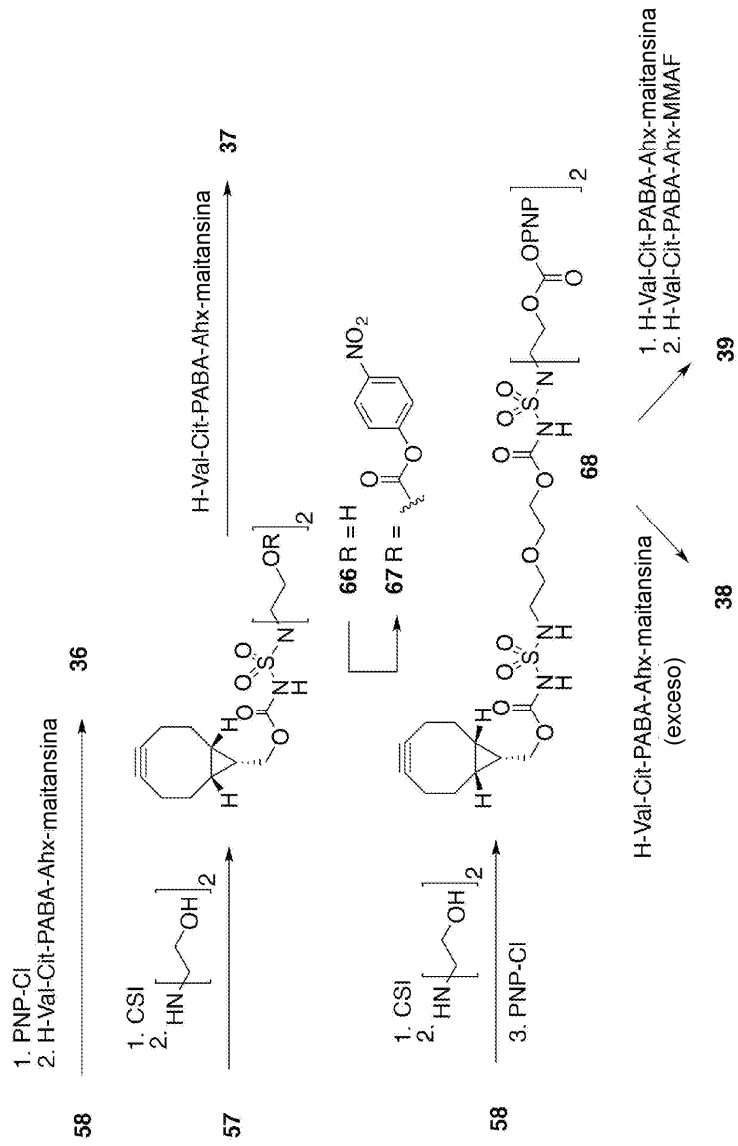


Fig. 22

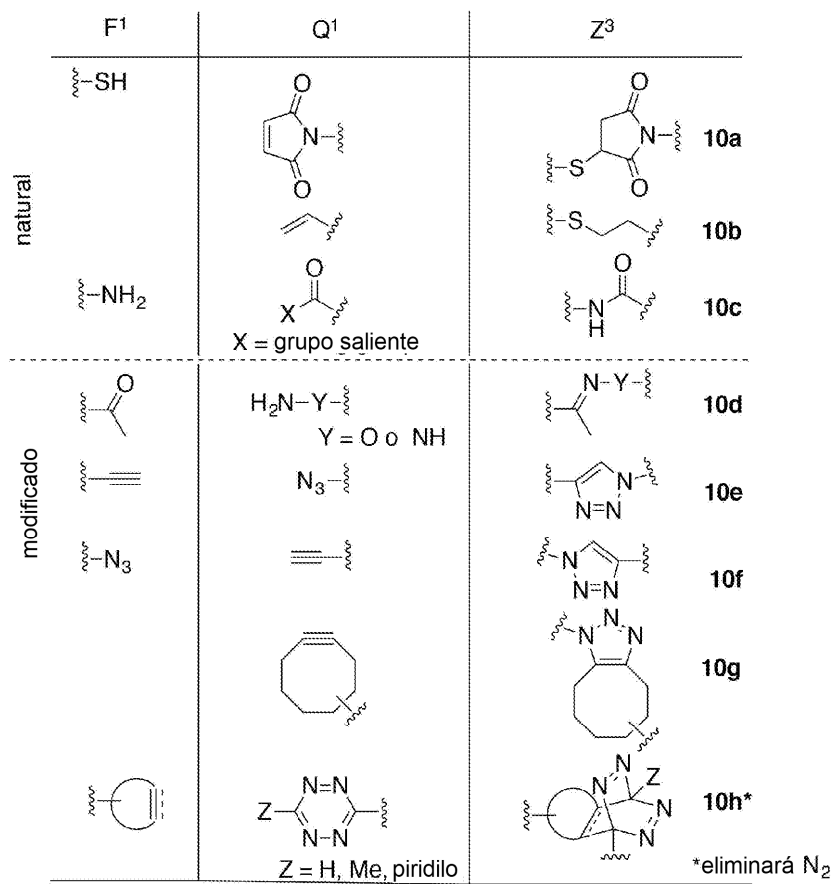


Fig. 23

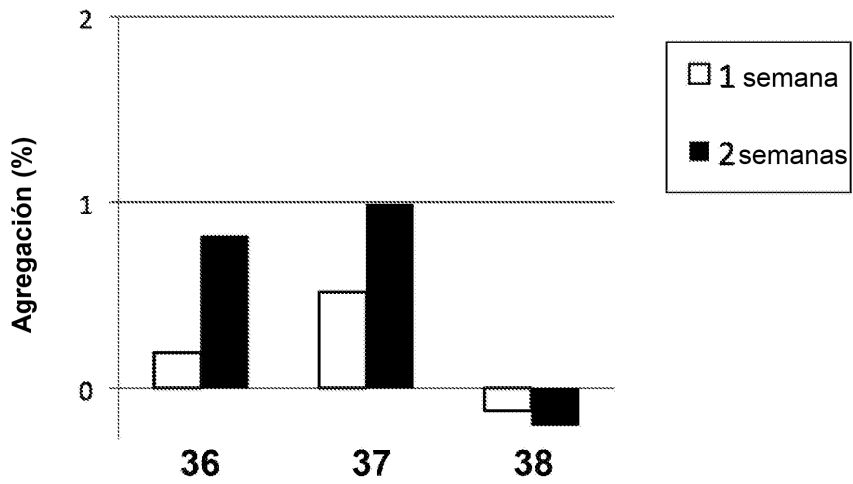


Fig. 24

